

ZERANOL: 'N ESTROGEEN-ANALOOG SE INVLOED OP DIE TESTIKULÊRE FUNKSIE VAN MUISE

deur

Rineé van Wyk
(B.Tech. Kliniese Tegnologie)

Proefskrif ingelewer om te voldoen aan die vereistes vir die graad

MAGISTER TECHNOLOGIAE: KLINIESE TEGNOLOGIE

in die

**FAKULTEIT GESONDHEID EN OMGEWINGSWETENSKAPPE
SKOOL VIR GESONDHEIDSTEGNOLOGIE**

Technikon Vrystaat

**Studieleier: Professor P H Wessels
Mede Studieleier: Me S Grobler
Interne Studieleier: Mnr E de J Vermaak**

**BLOEMFONTEIN
Januarie 2003**

Hierdie werk word met liefde opgedra aan Pappa.

Ek wil die volgende mense en instansies bedank vir hulle getroue ondersteuning tydens my studies:

Professor P H Wessels wat as promotor opgetree het en met insig en raadgewing die nodige leiding gegee het.

Sonja Grobler wat as mede promotor opgetree het.

Drs Amanda de Beer en Jeanette van der Merwe en personeel, Departement Anatomiese Patologie, UVS.

Susan Cooper, Vaerica Necsulesca en Daleen Terblanche, Departement Anatomiese patologie (Elektronmikroskopie), UVS.

Professor G. Joubert, Departement Biostatistieke, UVS.

Dr Freek Potgieter en personeel, Proefdiersentrum, UVS.

Drs N.Fourie en Swart en mnr Smit, Departement Farmakologie, UVS.

Yvette Kruger en Rika van der Merwe vir die tik van die proefskrif.

Me Riana de Beer vir die taalkundige versorging van die werk.

My ouers, my seuns D.J. en J.L., susters en swaers vir die bemoedigende belangstelling en ondersteuning dwarsdeur my akademiese loopbaan. Daarsonder sou die verwesenliking van hierdie ideaal nie moontlik gewees het nie.

My God, vir die vermoëns (geestelik, verstandelik en finansieël) wat op die regte tyd tot my beskikking was om te benut, te benut in oorvloed!

Hierdie studie is deur finansiële steun van die Sentrale Navorsingskomitee (SNK)
van die Technikon Vrystaat moontlik gemaak.

VERKLARING TEN OPSIGTE VAN SELFSTANDIGE WERK

Ek, Rineé van Wyk, verklaar hiermee dat die navorsingsprojek wat vir die verwerwing van die graad **MAGISTER TECHNOLOGIAE: KLINIESE TEGNOLOGIE: REPRODUKTIEWE BIOLOGIE** aan die Technikon Vrystaat deur my voorgelê word, my selfstandige werk is en nie voorheen deur my of enige ander persoon ter verwerwing van enige kwalifikasie voorgelê is nie.

.....
HANDTEKENIG VAN STUDENT

.....
DATUM

ZERANOL: 'N ESTROGEEN-ANALOOG SE INVLOED OP DIE TESTIKULÊRE FUNKSIE VAN MUISE

deur Rineé van Wyk

Omgewingsfaktore soos anaboliese stimulant speel 'n toenemende rol wat menslike fertiliteit betref. Die gebruik van Zeranol (7α -Zearalanol) as anaboliese groeipromotor in vee veroorsaak dat klein hoeveelhede van hierdie chemikalieë in diereweefsel neerslaan. Zeranol besit swak estrogeniese eienskappe wat die aktiewe verplasing van estrogen by estrogeniese reseptore tot gevolg het. Nuwe effekte soos die inhibering van die hipofise asook die atrofie van die testes, prostaat en seminale vesikels is die gevolg van oormatige estrogeniese blootstelling.

Doel: Om die uitwerking van Zeranoltoediening op die testikulêre funksie in muis as modelle te bepaal.

Metodiek: Muis ($n=20$) is in Toetsgroep 1 (ontvang 'n eenmalige Zeranoltoediening); Toets 2 ($n=20$, ontvang 'n Zeranoltoediening 48-uurliks vir vyf weke) en twee kontrolegroepe ($n=40$, ontvang slegs plasebo toedienings) verdeel. Semenevaluasies en elektronmikroskopiese evaluering is op die testisaspirate uitgevoer. Patologiese ondersoeke van die testisweefsel is ook uitgevoer.

Resultate: Slegs enkele waarnemings van inhibering van die semenkwaliteit asook enkele gevalle van patologie van die testisweefsel gemaak.

Gevolgtrekking: Zeranoltoediening volgens hierdie protokol, het nie 'n statisties betekenisvolle negatiewe effek op die testisfunksie van die muis gehad nie. Indien daar 'n onderdrukkende of inhiberende effek by mensstudies gevind word, kan dit moontlik klinies 'n beduidende effek op manlike fertiliteit hê, veral by mans met oligospermie (lae spermkonsentrasie).

ZERANOL: AN OESTROGEN ANALOGY'S INFLUENCE ON THE TESTICULAR FUNCTION OF MICE

by Rineé van Wyk

Environmental factors such as anabolic stimulants have an increased influence on human fertility. Zeranol (7α -Zearalanol) is used as such an anabolic growth promotor on livestock farms. Small amounts of this stimulant precipitate in the tissue of livestock. Zeranol has weak estrogenic characteristics and therefore cause active displacement of estrogen at receptor sites. Over exposure to estrogen results in the inhibiting and/or suppression of the pituitary gland as well as atrophy of the testes, prostate and seminal vesicles.

Aim: The determination the effect of Zeranol administration on the testis function of mice.

Methods: Test group 1 received only one administration of zeranol where as Test group 2 received a zeranol dosage every 48 hours for five days. Two groups receiving only placebo served as the control groups. Semen evaluation and electron microscopic evaluation was performed on the testis aspirations. Pathological evaluation on the testis tissue was also performed.

Conclusion: Only occasional observations were made of the inhibiting effect of Zearanol on semen quality and pathological testis tissue. This study showed that zeranol has had no statistical negative effect on the testis/testicular function in mice. If some inhibiting or oppression is observed in human fertility studies, it may be of clinical value especially for men with oligozoöpermia (low spermconcentration).

ORIËNTASIE EN AGTERGROND

1.1	INLEIDING	1
1.2	ZERANOL: 'N KORT OORSIG	2
1.3	DOEL.....	4
1.4	HIPOTESE	4
1.5	STUDIEGROOTTE/POPULASIE	4
1.6	STUDIEMATERIAAL	4
1.7	IN- EN UITSLUITINGSKRITERIA	5
1.8	STUDIE-UITVOERING	5
1.8.1	Studieprosedures.....	5
1.8.2	Farmakologiese Beplanning	5
1.8.3	Standaardisering van Tegnieke	6
1.8.4	Laboratorium Evaluasie	6
1.9	BIOMETRIESE ONTWERP	6
1.9.1	Algemeen	6
1.9.2	Steekproefgrootte	7
1.9.3	Statistiese Ontleding.....	7
1.10	BEGROTING	7
1.10.1	Farmakologiese Uitset	7
1.10.2	Proefdiere	7
1.11	ETIESE ASPEKTE EN AANVAARDE KLINIESE PRAKTYK.....	7
1.11.1	Volmagte	7
1.11.2	Goeie Kliniese Praktyk en Kwaliteitsversekering	7
1.11.3	Vrywaring.....	8
1.11.4	Vertroulikheid.....	8
1.12	NAVORSINGSVERBINTENIS.....	8
1.13	VERSLAGGEWING/RAPPORTERING.....	8
1.14	PUBLIKASIE/VOORDRAG VAN RESULTATE	8
1.15	GEVOLGTREKKING.....	8

ESTROGENE

2.1	INLEIDING	9
2.2	EKSOGENE ESTROGENE.....	10
2.3	FITO-ESTROGENE.....	10
2.4	ESTROGENE IN MELK	11
2.5	ESTROGENIESE CHEMIKALIË	11
2.6	INVLOED VAN ESTROGENE OP DIE ONTWIKKELING VAN DIE TESTIS EN MANLIKE GESLAGSTELSEL.....	13
2.7	AANTAL SERTOLISELLE EN SPERMPRODUKSIE	15
2.8	GEVOLGTREKKING.....	16

ZERANOL

3.1	INLEIDING	18
3.2	ZERANOL: 'N BESKRYWENDE OORSIG	18
3.3	DIE BIOLOGIESE AKTIWTEITE VAN ZERANOL.....	20
3.3.1	Estrogeniese Aktiwiteit.....	20
3.3.2	Fertiliteit	20
3.3.3	Teratogenisiteit	21
3.3.4	Genotoksiese Aktiwiteit van β -Resorsikliese Suurlaktone RALs.....	22
3.3.5	Karsinogenisiteit	22
3.4	MOONTLIKE BELANG VAN ZERANOLOORBLYFSELS	23
3.4.1	Inname van RALs in die Dieet	23
3.4.2	Geen-meetbare-effek-vlakke	24
3.4.3	Risikobepaling	24
3.4.4	Veiligheid van Hormoonstimulante	25
3.5	GEVOLGTREKKING.....	26

ENDOKRINOLOGIE VAN DIE MUISMODEL

4.1	INLEIDING	27
4.2	HIPOFISE.....	27
4.2.1	Anterior Lob	27
4.2.2	Biochemiese Struktuur van die Hipofisehormone: TSH, FSH, LH	28
4.2.3	Beheer van die Hipofisehormone	28
4.2.4	Follikelstimulerende en Luteïniseringshormone.....	29
4.2.5	Ontogenie en Senessensie.....	29
4.2.6	Hipotalamiese Defekte.....	31
4.3	TESTIS.....	31
4.3.1	Beskrywende Anatomie	31
4.3.2	Steroïedhormone van die Testes.....	32
4.3.3	Biosiniese en Meganisme van Werking van Testosteroon	33
4.3.4	Hormoonfunksies.....	33
	Manlike Reproductiewe Stelsel	34
	Submaksillêre Klier en Niere	34
	Brein	35
	Spierweefsel	35
4.4	HORMONALE BEHEER VAN TESTIKULêRE FUNKSIES	35
	• LH en Testosteroon	35
	• Ander Hipofisehormone	36
4.5	GEVOLGTREKKING.....	36



METODIEK

5.1	INLEIDING	37
5.2	STUDIEPROSEDURES	37
5.3	FARMAKOLOGIESE BEPLANNING	38
5.3.1	Loodsstudie	38
5.3.2	Dosisaanpassing	39
5.4	LABORATORIUMPROSEDURE VIR SEMENANALISE	39
5.5	ELEKTRONMIKROSKOPIESE MONSTERVOORBEREIDING	40
5.6	MORFOLOGIESE EVALUERING VAN SERTOLISELLE, LEYDIGSELLE EN SPERMATOGONIALE STAMSELLE.....	41
5.6.1	Histologie	41
5.6.2	Sitologie van Spermatogonia	42
5.6.3	Sitologie van Sertoliselle.....	42
5.6.4	Sitologie van Leydigselle	43
5.7	OPSOMMEND.....	44



RESULTATE

6.1	INLEIDING	45
6.2	MASSABEPALINGS	45
6.3	TESTISMASSA-EVALUASIE	46
6.4	SPERMKONSENTRASIE ($\times 10^6/\text{ml}$)	46
6.5	KWANTITATIEWE MOTILITIET (% lewende spermatozoa)	47
6.6	KWALITATIEWE MOTILITIET	48
6.7	PATOLOGIESE EVALUERING	49
6.8	BESPREKING	50
6.9	GEVOLGTREKKING	53



BESPREKING

7.1	INLEIDING	54
7.2	OPSOMMING VAN DIE KERNGEDAGTES EN HOOFBEVINDINGS VAN DIE LITERATUURSTUDIE	54
7.3	OPSOMMING VAN DIE HOOFBEVINDINGS VAN HIERDIE STUDIE	55
7.4	ALGEMENE AANBEVELINGS EN TEKORTKOMINGE	56
7.5	AANBEVELINGS VIR TOEKOMSTIGE NAVORSING	57
7.6	GEVOLGTREKKING.....	58

Verwysings	59
Aanhangsel 1	69
Aanhangsel 2	73
Aanhangsel 3	77
Aanhangsel 4	84

Figuur

Bladsy

Figuur 2.1	Posisies waar estrogeen (afkomstig vanaf die moeder) 'n negatiewe effek kan uitoefen, met donker lyne en pyle aangedui. Moontlike meganismes en fisiologiese weë waar estrogene tydens swangerskap moontlik onderdrukte ontwikkeling en afdaal van testes en ander abnormaliteite van die reprodutiewestelsel kan hê.....	13
Figuur 3.1	Struktuur van β -resorsikliese suur laktone (RALs).....	19
Figuur 3.2	Die vergelykende metaboliete van Zeranol en Zearalenoen.	19

Tabel		Bladsy
Tabel 6.3	Testismassa-evaluasie.....	46
Tabel 6.4	Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$).....	46
Tabel 6.5	Kwantitatiewe Motiliteit (% lewende spermatozoa).....	47
Tabel 6.6	Kwalitatiewe Motiliteit	48

RALs	-	β -Resorsikliese suurlaktone
DES	-	Dietiel-stilbestrol
SHBG	-	Sekshormoonbindingsglobulien
FSH	-	Follikelstimulerende hormoon
MIS	-	Mülleriaanse inhiberingssubstans
GH	-	Groeihormoon
PRL	-	Prolaktien
AKTH	-	Adrenokortikotope hormoon
TSH	-	Tiroïedstimulerende hormoon
LH	-	Luteïniserende hormoon
GnVH	-	Gonadotropienvrystellingshormoon
RIE	-	Radioimmunisering
DNA	-	Deoksiribonukleïensuur
RNA	-	Ribonukleïensuur
DHT	-	Dehidrotestosteroon
UVS	-	Universiteit van die Vrystaat
CO₂	-	Koolstofdioksied
SAS	-	Statistiese Analitiese Sisteem

ORIËNTASIE EN AGTERGROND

1.1 INLEIDING

Anaboliese middels is reagentie wat deur middel van stimulasie van proteïensintese verhoogde spiergrootte en spierkrag by mense sowel as diere veroorsaak. Benewens hierdie middels se medisinale waarde word dit deur atlete gebruik om beter prestasies in mededingende sportsoorte te verkry. Net so word verbeterde prestasie by renperde verkry, maar by slagvee word anaboliese middels toegedien met die oog op 'n hoër slaggewig en verbeterde voeromset. Die samestelling van hierdie middels wat effektiewe verhoogde prestasie by mense en renperde veroorsaak, se struktuur stem ooreen met dié van testosteroon, die natuurlike androgeen. Daarenteen word androgeniese en estrogeniese middels of 'n kombinasie van albei by slagvee gebruik. Die estrogeniese middels kan voortkom uit die natuurlike steroïed 17β -estradiol of kan 'n nie-steroïedstruktuur soos diethylstilbestrol of zeranol hê.¹

Die nie-medisinale gebruik van anaboliese middels deur atlete word eties bevraagteken. Kommer oor die nuwe-effekte van sulke middels wat varieer van hormonale steurnisse tot neoplasie na langdurige gebruik en meer nog, die toksikologie wat daarmee gepaard gaan, is toenemend. Die grootste kommer wat vee betref, is die moontlikheid van oorblyfsels van die anaboliet in die vleis wat vir verbruikers nadelig mag wees. Tans word die toediening van anaboliese middels in sekere lande gewettig, maar in ander lande afgekeur.¹ Die toksikologiese effek van sulke anaboliese middels in voedselsoorte is 'n groeiende bekommernis as gevolg van 'n groter bewustheid van die publiek se kant af teenoor die

blootstelling van die omgewing aan chemiese kontaminante. Min inligting is bekend met betrekking tot die meganismes onderliggend aan die toksiese uitwerking van die anaboliese. Die hipotetiese risiko's wat met hierdie middels geassosieer word, is dus 'n moeilike taak.

Die differensiasie en morfogenese van weefsel en organe is gedurende die perinatale periode sensitief vir verskeie tipes stimulasie. Differensiasie van die reprodutiewe stelsel asook die brein self word gedurende die perinatale periode deur geslagsteroïede beïnvloed. Onomkeerbare en langtermynwysigings van die sentrale en perifere meganismes wat die reprodutiewe funksies reguleer, is in diepte op vroulike knaagdiermodelle nagevors. Sommige van hierdie wysigings mag direk of indirek tot karsinogenese aanleiding gee en lê die basis vir steriliteit in die latere lewe. Minder inligting oor langtermynveranderinge in manlike soogdiermodelle as in vroulike diemodelle, is bekend.²

1.2 ZERANOL: 'N KORT OORSIG

Die gebruik van Zeranol (7α -zearalanol) as anaboliese stimulant in slagvee veroorsaak dat residue van die chemikalieë in diereweefsel neerslaan. Zeranol is 'n sintetiese derivaat van zearalenone, 'n natuurlike miko-estrogeen wat dikwels in voedselsoorte gevind word as gevolg van die infeksie van graan deur *Fusarium* (*Fusarium graminearum*) skimmel.³

Zeranol en zearalenone is albei β -resorsikliese suurlaktone (RALs) of miko-estrogene. Baie samestellings van hierdie basiese formule het swak estrogeniese eienskappe en is chemies, struktureel en biologies verwant. Zeranol ontwikkel *in vitro* 'n affiniteit vir estrogenreseptore en aktiewe displasie van estrogen vind plaas. Die gevolg, soos met estradiol, is die inhibisie van die hipotalamus en atrofie

van die ovaria, testes, prosta vesikels. Ander newe-effekte soos uterotrofiese gevolge is ook waargeneem. Geen toksiese effek anders as die estrogeniese eienskappe van zeranol is waargeneem nie.⁴

Estradiol is as 'n nie-mutageen aangedui, maar die wysiging van dieremodelle se hormonale spektrum as gevolg van estradiol kan aanleiding gee tot karsinogeniese effekte. Hierdie karsinogeniese meganisme is nog nie presies bekend nie. In teenstelling met estradiol is anaboliese stimulant, spesifiek zeranol, aan meer indringende veiligheidsondersoeke onderwerp. Baie van hierdie chemikalieë waarmee die omgewing in die laaste vyftig jaar besoedel is, is swak estrogenies, maar weerstandig teen bio-afbraak en daarom vind 'n ophoping in die menslike liggaam plaas.^{2,4,5,6,7}

Abnormale ontwikkeling en funksionering van die manlike reprodutiewestelsel het die afgelope 30-50 jaar toenemend voorgekom. Voorbeelde hiervan sluit testikulêre kanker, kriptorgidisme en uretrale abnormaliteite soos hipospadie in. 'n Treffende verlaging in semenvolume en spermkonsentrasie van "normale" volwasse mans is ook aangedui. Aangesien hierdie veranderinge redelik onlangs in verskeie lande waargeneem is, word van die veronderstelling uitgegaan dat hierdie negatiewe tendens deur omgewingsfaktore en/of lewenswyses veroorsaak word, eerder as deur genetiese veranderinge.^{2,4,5,6,7}

Naas die tydstip van zeranolblootstelling, is die dosis belangrik sover dit testikulêre inkorting aangaan. Vele navorsers het inkorting of onderdrukking van testisontwikkeling en -funksionering waargeneem indien bulle op 'n jong ouderdom (<90 dae ouderdom) of gedurende soog en voerkraalafronding, zeranolinplantings ontvang het.⁵

Soortgelyke waarnemings is v  vel as op 'n jong ouderdom by muis, rotte en ander knaagdiere gevind. As gevolg van eties-beperkinge is min data met betrekking tot die effek van hormone op die anatomie en fisiologie van menslike testikulêre selle en weefsel beskikbaar.⁸

1.3 DOEL

Die doel van die studie was om die uitwerking van zeranoltoediening op die testikulêre funksie van muis te bepaal. Die muis spesifiek is sensitief vir estrogene en is dus as geskikte model gevind om die konsep van menslike blootstelling aan zeranol te verstaan.⁵ Die muismodel is 'n erkende en geskikte model vir navorsing. Die resultate kan dus gebruik word om logiese gevolgtrekkings te maak wat ook moontlik op die mens van toepassing kan wees. Omgewingsfaktore speel 'n toenemende rol by menslike infertiliteit en indien hierdie omgewingsinvloed op diermodelle bestudeer word, kan moontlike voorkomende maatreëls of aanbevelings vir menslike reprodktiewe probleme getref word.

1.4 HIPOTESE

H1: Zeranolblootstelling het 'n negatiewe effek op testisfunksie van muismodelle.

HA: Zeranol het nie 'n negatiewe effek op testisfunksie van muismodelle nie.

1.5 STUDIEGROOTTE/POPULASIE

'n Loodsstudie met vyf muis in elke groep sal uitgevoer word. Die studiegrootte sal na aanleiding van die uitkoms en statistiese analise aangepas word.

1.6 STUDIEMATERIAAL

Testisweefsel en spermaspiraas van die epididimis van manlike muismodelle.



1.7 IN- EN UITSLUITING

Insluitings: manlike muis 3 weke ouderdom (speen ouderdom) tot 8 weke ouderdom, $N = 60$, begin dus behandeling op 3 weke ouderdom deurlopend tot en met 8 weke.

Uitsluitings: manlike muis jonger as 3 weke of ouer as 8 weke.

Populasiebeperkings: manlike muis in aanhouding, aan dieselfde voedings-, omgewings- en hanteringsfaktore blootgestel.

1.8 STUDIE-UITVOERING

1.8.1. Studieprosedures

- Blootstelling van muis ($N = 60$) aan zeranol op vasgestelde ouderdomme, dosis en vir 'n spesifieke tydspanne (48-uurlik vir 5 weke). Opoffering van die muis op 8 weke ouderdom vir die verkryging van studiemateriaal (testisweefsel en epididimisaspiraate).
- Evaluering van testismassa en semenevaluasie van epididimisaspiraate.
- Ligmikroskopiese evaluasie van testissnitte.
- Elektronmikroskopiese evaluasie van spermatozoa snitte.

1.8.2. Farmakologiese Beplanning

Toetsgroep 1: Muis 3 weke ouderdom, $N = 20$. Eenmalige toediening van zeranol-dosis, gevolg deur daaglikse toediening placebo tot en met 8 weke ouderdom.

Kontrolegroep 1: Muis 3 weke ouderdom, $N = 20$. Daaglikse placebotoediening vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom.

Toetsgroep 2: Muis vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, N = 20 herhaaldelike zeronoltoedienings 48-uurliks.

Kontrolegroep 2: Muis vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, N = 20, herhaaldelike 48-uurlikse placebotoedienings.

Alle toedienings is intraperitoniaal gedoen en al die muis is op 8 weke ouderdom opgeoffer.

1.8.3. Standaardisering van Tegnieke

Slegs twee navorsers sal die toetsstof-toediening, disseksie en andrologiese evaluasies van die testisweefsel en epididimisaspiraats uitvoer. Elektronmikroskopie en ligmikroskopie is volgens 'n gestandaardiseerde metode uitgevoer.^{67,68,69,70,71} Semenanalise is volgens die Wêreldgesondheidsorganisasie (WGO) se standaardmetode uitgevoer.⁹

1.8.4. Laboratorium Evaluasie

Massabepalings van die testis sal geneem word. Semenanalise op epididimisaspiraats is volgens die Wêreldgesondheidsorganisasie (WGO) se standaard metode uitgevoer.⁹

1.9 BIOMETRIESE ONTWERP

1.9.1. Algemeen

Muismodelle is deur die Proefdierseenheid van die Universiteit van die Vrystaat voorsien en gehuisves.

1.9.2. Steekproefgrootte

Loodsstudie: Twintig muise is ewekansig in vier groepe verdeel. Die monstergrootte sou na aanleiding van die loodsstudie se uitslag aangepas en vasgestel word.

1.9.3. Statistiese Ontleding

Die T-toets is gebruik met 'n 95% vertrouensinterval. 'n Korreksiefaktor is vir die loodsstudie in berekening gebring.

1.10 BEGROTING

1.10.1. Farmakologiese Uitset

α -Zearalanol (Sigma-Aldrich) kwoteer R703.61/5 mg. Vir die toediening van 150 μ g/kg-dosisse vir 60 proefdiere volgens die protokol was 3 x 5 mg houertjies α -zearalanol benodig teen 'n beraamde koste van R2110.83.

1.10.2. Proefdiere

Sestig muise teen R12.50/muis. Totaal R750.00.

1.11 ETIESE ASPEKTE EN AANVAARDE KLINIESE PRAKTYK

1.11.1. Volmagte

Etiëkomitee vir Proefdiernavorsing: 03/2000.

1.11.2. Goeie Kliniese Praktijk en Kwaliteitsversekering

- Navolging van goedgekeurde protokol.
- Hantering van muise en verkryging van weefselmonsters sal eties, wetenskaplik en korrek geskied.

- Afmetings en monstervoor die verskillende evaluasies sal deur spesifieke persone in die betrokke vakgebied uitgevoer word.

1.11.3. Vrywaring

Geen vrywaring was van toepassing nie.

1.11.4. Vertroulikheid

Geen inligting of resultate sal voor afhandeling bekendgemaak word nie.

1.12 NAVORSINGSVERBINTENIS

Die navorsers onderneem om hulle by die navolging van die protokol te hou.

1.13 VERSLAGGEWING/RAPPORTERING

Verslaggewing sal aan die Proefdieretiekkomitee na afhandeling van die projek gedoen word.

1.14 PUBLIKASIE/VOORDRAG VAN RESULTATE

Voordrag tydens Akademiese Jaardag, UVS en publikasie in vaktydskrifte van toepassing op uitkoms van studie.

1.15 GEVOLGTREKking

Indien bevind word dat hormoonstimulante wat estrogeniese eienskappe openbaar wel die normale funksionering van muistestes negatief beïnvloed, behoort die inname van sulke stimulant by mense bepaal word. 'n Berekende estrogeniese-geen-effekvlak van "estrogeniese" voedselprodukte wat verbruik word, sal dus die veiligheid vir die gebruik van vleis- en ander voedselprodukte deur die mens, aandui.

ESTROGENE

2.1 INLEIDING

Die voorkoms van abnormale ontwikkeling en/of abnormaliteite tydens die ontwikkeling van die manlike reprodutiewe stelsel het in die afgelope 30 tot 50 jaar meer as verdubbel terwyl spermtellings byna met die helfte afgeneem het.⁶ Dieselfde tendens is waargeneem by seuns indien hul moeders gedurende swangerskap diëtiel-stilbestrol (DES)-blootstelling gehad het. Soortgelyke data is ingesamel indien dragtige diere vir 'n kort tydperk aan eksogene estrogene of DES blootgestel word.⁶ Daar is toenemende kommer met betrekking tot estrogeenblootstelling (eksogeen en *in utero*), wat aanleiding tot manlike reprodutiewe abnormaliteite soos testikulêre kanker¹⁰, kriptorgidisme^{11,12} en 'n merkbare afname in semenvolume en spermkonsentrasie van normale volwasse mans kan gee.¹³ Testikulêre kanker, kriptorgidisme en hipospadie is problematiese abnormaliteite wat moontlik al gedurende fetale ontwikkeling ontstaan het, en tesame met verlaagde spermkonsentrasie kan hierdie afwykings 'n gemene oorsprong hê.¹¹ Eksogene en *in utero* blootstelling aan estrogeenvlakke hoër as normaal en die negatiewe verandering in manlike reprodutiewe ontwikkeling en funksionering oor die afgelope 40 tot 50 jaar toon 'n duidelike ooreenkoms wat geldige komervrae laat ontstaan het. "Humans now live in an environment that can be viewed as a virtual sea of estrogens".¹⁴ Vele navorsers het die bewyse vir veranderinge van estrogeenblootstelling al vir die afgelope halfeeu nagevors om vas te stel of daar enige bekende meganismes is wat aanleiding kan gee tot die negatiewe verandering in die manlike reprodutiewe ontwikkeling en funksionering.⁶

2.2 EKSOGENE ESTROGENE

Sintetiese estrogeenanaloeë neig om gevaarlik te wees vir die mens, omrede dit vervaardig word om oraal aktief te wees en dus weerstandig teen bio-afbraak is. DES en ander estrogeenanaloeë word vir die afgelope 20 tot 30 jaar in 'n breë spektrum van veebedryfaktiwiteite gebruik en is gedurende hierdie tydperk nie as 'n risiko vir die mens beskou nie.⁶ Abnormaliteite wat waargeneem is, was in kinders waar die moeders met DES behandel is, en dit het tot veranderinge ten opsigte van die gebruik van DES aanleiding gegee om sodoende die risiko's vir menslike gebruik te verminder. Anaboliese estrogene wat oraal aktief is, is reeds in 1981 in Europa verbied. Die meeste anaboliese estrogene wat tans in die veebedryf gebruik word, is nie oraal aktief nie.⁶

Ander gebruike van estrogeenanaloeë wat oor die afgelope 20 tot 40 jaar toegeneem het, is die orale kontrasepsiepil (bv etiniel estradiol). Hoewel daar etiniel estradiol in waterbronne aangemeld is, is daar min data met betrekking tot die konsentrasie estradiol in drinkwater. Net soos DES bind etiniel estradiol nie aan die sekshormoon-bindingsglobulien (SHBG) waaraan die meeste estrogene in bloed normaalweg bind nie. Dit beteken dus dat etiniel estradiol 'n hoë bio-aktiwiteit het indien dit ingeneem word.⁶

2.3 FITO-ESTROGENE

Die afgelope 40 jaar het veranderinge in diëte in verskeie lande 'n verhoogde estrogeenwaarde in die omgewing teweeggebring, omrede baie plante en fungi fito-estrogene bevat. Dit is ook reeds bewys dat indien diere hierdie plante en fungi inneem, fito-estrogeenabnormaliteite in hul normale reprodusktiewestelsel voorkom.¹⁵ Die gebruik van soja – die rykste bron van fito-estrogene – het in die afgelope twee of

meer dekades as proteïenplaa is toegeneem.¹⁶ Volgens Verdeal en Ryan¹⁶, is navorsingsprogramme aangewend om die biologiese effek van fito-estrogene in die mens te ondersoek. Die gevolgtrekking was dat blootstelling aan fito-estrogene alleen se effek te klein is om direkte estrogeniese gevolge by die meeste volwassenes te kon hê. Fito-estrogene kan 'n stimulerende effek op die lewer hê, sodat meer sekshormoonbindingsglobulien (SHBG) geproduseer word wat veroorsaak dat die konsentrasie van biobeskikbare endogene estrogeen verlaag.¹⁷

2.4 ESTROGENE IN MELK

Gedurende die 1940's en 1950's was die tendens dat ontwikkelde lande se suiwelgebruik te hoog is. Te hoë suiwelverbruik mag lei tot veranderinge in estrogeenmetabolisme soos bo genoem, maar mag ook ander implikasies tot gevolg hê. In die hedendaagse moderne boerderysisteme is die meeste koeie dragtig, maar steeds in laktasie. Koeimelk bevat dus 'n noemenswaardige hoeveelheid estrogene – meestal estroonsulfaat.¹⁸

Tydens die pasteurisasieproses van melk in die vervaardiging van babamelkformules word estrogeen vernietig, hoewel dit nie duidelik is waarom dit gebeur en of estrogeen steeds teenwoordig is in ander suiwelprodukte nie.¹⁸ In watter mate absorpsie van estroonsulfaat in die menslike (volwasse en/of kind) spysverteringskanaal plaasvind, is ook nog debatteerbaar en of die invloed van vesel in die dieet hierdie absorpsie beïnvloed of nie.⁶

2.5 ESTROGENIESE CHEMIKALIEË

Die afgelope 50 jaar besoedel ons die omgewing met verskeie chemikalieë wat swak estrogeniese eienskappe openbaar.^{6,14} Hierdie chemikalieë wat in ons voedselketting voorkom, is merkwaardig bestand teen biodegradering en versamel in

die menslike liggaam.⁶ In ve word hoë konsentrasies van hierdie chemikalieë geassosieer met reprodutiewe abnormaliteite, wat veranderde semenkwaliteit van volwasse rotte insluit na neonatale blootstelling via moedersmelk.⁶ Slegs 'n enkele blootstelling op dag 15 van dragtigheid toon 'n verhoogde voorkoms van kriptorgidisme by die manlike nageslag, waar die blootstelling nanogram hoeveelhede van gechlorineerde koolwaterstof TCDD (dioxin) was. Geen nadelige effek op die moeders is waargeneem nie. Buiten die verhoogde voorkoms van kriptorgidisme is dosisgebonde verminderde testismassa en verlaagde spermkonsentrasies ook in volwassenheid gevind. Die verlaagde spermkonsentrasies is 'n gevolg van verminderde aantal Sertoliselle. Terwyl dit reeds in 'n wye spektrum van dierestudies bewys is, is dit nie duidelik of blootstelling aan estrogeniese chemikalieë genoegsaam is om dieselfde effekte op mans te hê nie.⁶

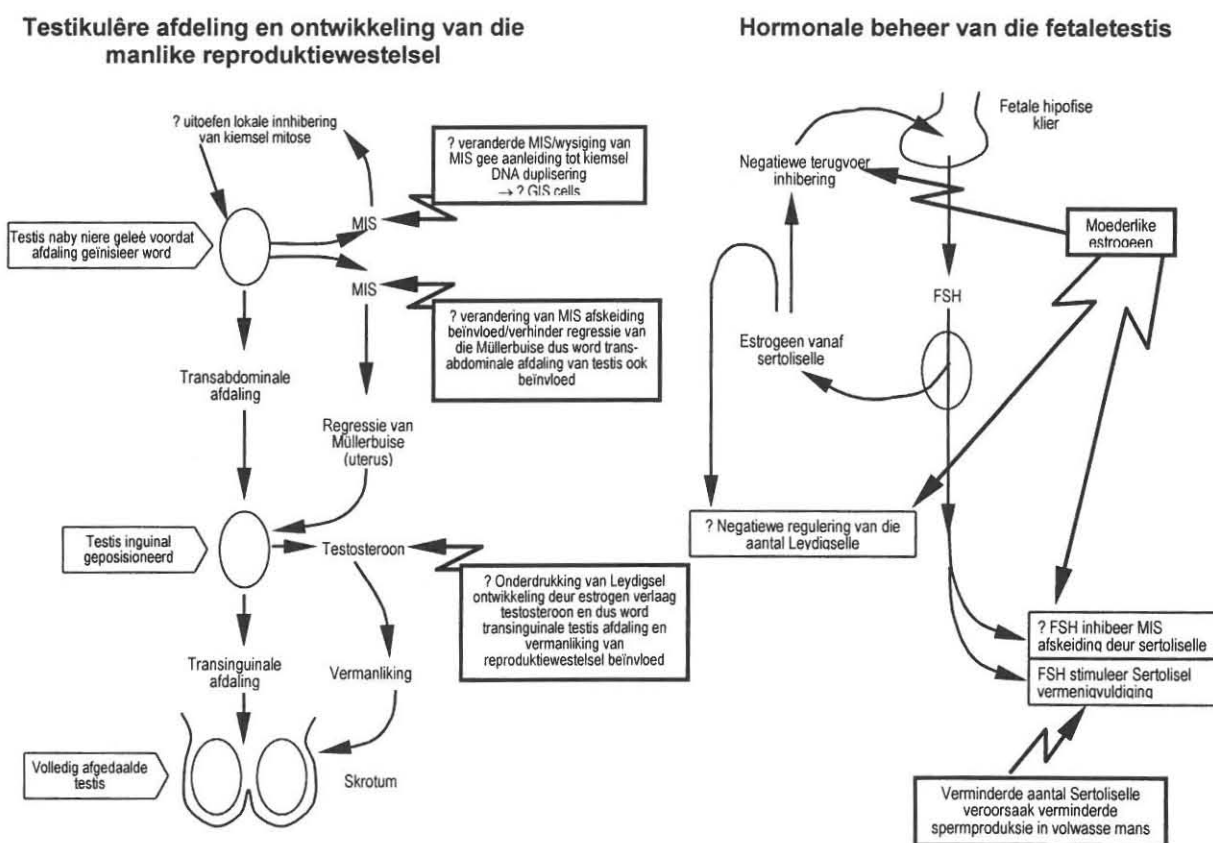
Veranderinge wat moontlik mag intree as gevolg van estrogenblootstelling is moeilik om te kwantifiseer, veral indien daar vermoed word dat sulke veranderinge tydens swangerskap mag plaasvind. Die veiligste afleiding wat gemaak kan word, is dat swanger vroue (en mense in die algemeen) meer aan estrogen blootgestel word as 50 jaar gelede. Die bron van hierdie estrogen, die verspreiding en die gevolge daarvan mag ook verskil van land tot land, en van mens tot mens. Verhoogde blootstelling aan estrogen kan of kan nie die voorkoms van abnormaliteite in manlike reprodutiewe ontwikkeling en funksionering hê. "Swak" estrogen het ook 'n kragtiger uitwerking op 'n fetus en neonate as op volwassenes.⁶

2.6 INVLOED VAN ESTR

ONTWIKKELING VAN DIE TESTIS

EN MANLIKE GESLAGSTELSEL

Die ontwikkeling van die manlike geslagstelsel, die degenerering van die strukture (Müllerbuis) wat oorsprong gee aan die vroulike geslagstelsel en die vroeë ontwikkeling en afdaal van die testis in die skrotum, is gebeurtenisse wat gedurende die fetale ontwikkeling plaasvind.^{19,20}



Figuur 2.1 Die ontwikkelingsstadia waar estrogen (afkomstig vanaf die moeder) 'n negatiewe effek kan uitoefen, is met die donker lyne en pyle aangedui. Moontlike meganismes en fisiologiese weë waar estrogene tydens swangerskap moontlik onderdrukte ontwikkeling en afdaal van testes en ander abnormaliteite van die reprodutiewestelsel kan hê.

Die ontwikkelingstadium waar (mstig vanaf die moeder) 'n negatiewe effek kan uitoefen, is met donker lyne en pyle aangedui. Indien estrogeen aan dragtige diere of swanger vroue toegedien word, word aangedui dat daar abnormaliteite in al die bogenoemde stadiums is, maar daar is geen bewys dat hierdie abnormaliteite wel via hierdie aangeduide roetes plaasgevind het nie. Moontlike meganismes en fisiologiese weë waar estrogene tydens swangerskap moontlik onderdrukte ontwikkeling en afdaal van testis en ander abnormaliteite van die reprodutiewestelsel kan hê.⁶

Die basis van ontvanklikheid vir die negatiewe uitwerking van estrogeen is gebaseer op die normale verloop en produksie van estrogene deur die Sertoliselle en die moontlikheid bestaan dat hierdie estrogeenproduksie as negatiewe terugvoer optree na die fetale hipofise, om die afskeiding van follikelstimulerende hormoon (FSH) te reguleer.⁶ FSH is die dryfveer vir die Sertoliselle se estrogeenproduksie, die vermeerdering van Sertoliselle en ook moontlik die regulering van die afskeiding van ander hormone, Mülleriaanse inhiberingssubstans (MIS), wat vir die degenerasie van die Müllerbuis verantwoordelik is.²⁰

Die blywende teenwoordigheid van Müllerbuis word gewoonlik geassosieer met gefaalde testikulêre afdaling (sien Figuur 2.1). Tans word aangeneem dat MIS 'n rol speel tydens die transabdominale fase van normale testikulêre afdaling. Die versteuring van MIS-produksie kan dus normale testikulêre afdaling en/of ontwikkeling benadeel.²⁰ MIS mag ook verantwoordelik wees vir die onderdrukking van die vermenigvuldiging van kiemselle tydens die fetale stadia omdat MIS die vermoë het om die groei van verskeie seltipes te inhibeer, insluitend sekere ovariële tumorselle. Die vermoede bestaan ook dat abnormale kiemselle wat aanleiding gee tot die meeste testikulêre kankers in die latere lewe, gedurende die fetale lewe ontwikkel het en meestal 'n ongewone hoë DNA-inhoud bevat.²¹ Versteurde

afskieding van MIS mag (word met testikulêre karsinoom. Risikofaktore wat aanleiding mag gee tot testikulêre karsinoom sluit in: kriptorgidisme en ander abnormaliteite van die ontwikkeling van die manlike geslagstelsel (bv. gonadale disgenese), wat 'n gemeenskaplike oorsprong het. Dragtige muise wat aan etiniel estradiol blootgestel was, het 'n verhoogde voorkoms van gonadale disgenese, kriptorgidisme, en testikulêre karsinoom in manlike nakomelinge, asook ingekorte Leydigselontwikkeling en 'n verlaagde aantal Sertoliselle getoon.^{22,23}

In volwasse en prepubertale rotte is estrogeen se negatiewe uitwerking as gevolg op die negatiewe regulering op die Leydigselontwikkeling, omrede die duplisering van Leydigselvoorlopers, geïnhibeer word.²⁴ Hierdie reguleringsmeganisme van Leydigsel tree moontlik al in die fetale fase in werking. Leydigsel is die bron van testosteroon, wat vir die ontwikkeling van die manlike geslagstelsel, die uiterlike voorkoms van die geslags-organe en vir die tweede fase van testikulêre afdaling verantwoordelik is.^{19,20} Blootstelling aan abnormale hoë estrogeenkonsentrasies mag testosteroonproduksie deur die Leydigsel (verminderde Leydigsel) negatief beïnvloed, wat aanleiding kan gee tot ingekorte vermanliking van die reprodutiewe manlike anatomie en wat geïnhibeerde fisiologiese werking tot gevolg het. Dieselfde nadelige effekte word by diere waargeneem wat estrogeen en/of chemiese blootstelling gehad het.^{24,25}

2.7 AANTAL SERTOLISELLE EN SPERMPRODUKSIE

Hoewel die ontwikkeling van die manlike geslagstelsel deur estrogene via fisiologiese weë beïnvloed kan word, bestaan die vraag nog: hoe kan die onderdrukking van ontwikkeling gekoppel word aan die verlaging van volwasse mans se spermkonsentrasie? Die antwoord op hierdie vraag, na aanleiding van

proefdierstudies, is deur die (Sertoliselle te verander of te inhibeer (sien Figuur 2.1). Gedurende fetale, neonatale en prepubertale lewenstadia vind Sertoliselvermenigvuldig plaas wat grootliks deur FSH beheer word.^{24,26} Volgens Sharpe²⁴ neem die Sertoliselvermenigvuldiging af indien FSH-sekresie geïnhibeer word. Dit vind veral plaas by neonate waar FSH-sekresie baie sensitief is vir die blootstelling aan eksogene estrogene.²⁴ Gedurende 'n spesifieke tydstip gedurende postnatale leeftyd staak Sertoliselduplisering en maturasie van hierdie selle vind plaas. 'n Belangrike opmerking is dat hierdie selmaturasiestadia ooreenstem met die drastiese verlaging in afskeiding van estrogene en MIS. Die prepubertale ontwikkeling is belangrik omdat Sertoliselgetalle gevestig word. Sertoliselvestiging het 'n belangrike gevolg in die volwasse lewe, aangesien Sertoliselle verantwoordelik is vir die organisering en regulering van spermatogenese. Elke Sertolisel kan slegs 'n bepaalde aantal germinale kiemselle gedurende die ontwikkeling tot en met spermatozoa onderhou.^{27,28} Die gevolgtrekking is dus: hoe laer die aantal Sertoliselle wat gevestig is, hoe laer sal die maksimum spermproduksie wees. Alle studies op proefdiere het getoon dat verhoging of verlaging van die aantal Sertoliselle op 'n vroeë leeftyd die testisgrootte en spermproduksie in die volwasse leeftyd bepaal.²⁴ In hierdie studies word slegs die kwantiteit sperme beïnvloed, maar nie die spermkwaliteit nie. Die belangrike feit is dat die toediening van estrogeen aan diere in fetale en vroeë neonatale fases aanleiding gee tot kleiner testes en verlaagde spermkonsentrasies in die volwasse leeftyd. In ooreenstemming met dierestudies toon seuns van vroue wat gedurende swangerskap aan DES blootgestel was, 'n verhoogde voorkoms van lae spermkonsentrasies.²⁴

2.8 GEVOLGTREKKING

Medikasie, kontrasepsie, plantaardige voedselprodukte, vleis en suiwelprodukte asook chemikalieë waarmee die mens sy omgewing “verbeter” of vooruitgang laat beleef het, is produkte wat fisies ingeneem word en dus die moontlikheid van estrogeen neerslae in die menslike liggaam vergroot. Estrogeniese neerslae wat in die menslike liggaam akkumuleer, beïnvloed die fisiologiese funksie van die menslike liggaam.

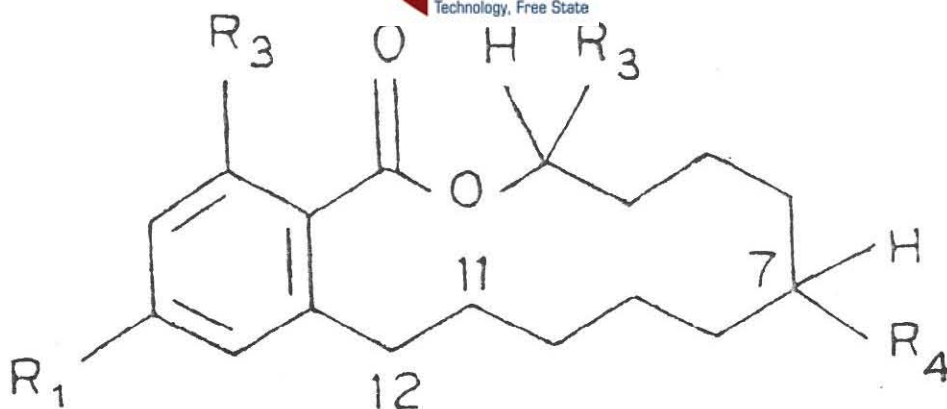
ZERANOL

3.1 INLEIDING

Groeipromotor inplantate wat estradiol bevat, is vir gebruik by plaasdiere in verskeie lande goedgekeur.^{4,37,38} Geen ekstensiewe toksologiese dataverslae word vereis waar estradiol-hormone of enige ander hormonale analoë as inplantaat gebruik word nie. Hormoonvlakke van vleisprodukte waar inplantate gebruik is, toon nie statisties betekenisvolle verskille van vleisprodukte afkomstig van slagvee wat nie behandel is nie. Hoewel diere wat estradiol oraal ingeneem het wel karsinogeniese risiko's getoon het, is oor die algemeen aanvaar dat dit nie newe-effekte vir verbruikers van estradiol blootgestelde vleisprodukte inhou nie. In teenstelling met estradiol word dié groeistimulante wat zeranol bevat aan meer veiligheidsevaluasies onderwerp. Hierdie studies maak dit dus moontlik om die effekte van zeranol en naverwante miko-estrogene wat natuurlik in voedsel voorkom, te vergelyk.⁴

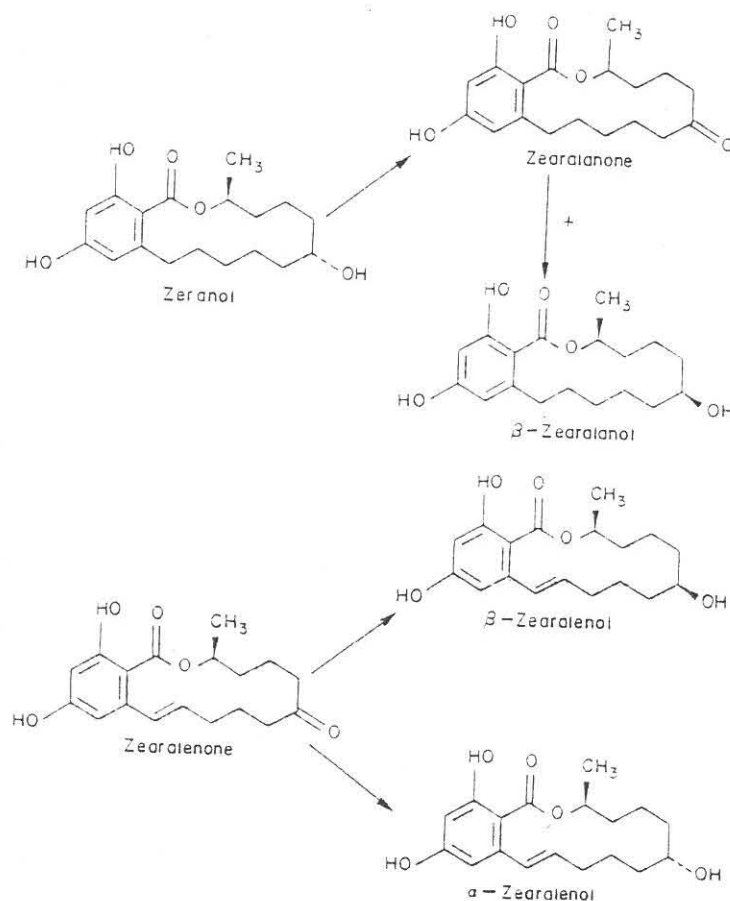
3.2 ZERANOL: 'N BESKRYWENDE OORSIG

Zeranol is 'n derivaat van, en is chemies baie na verwant aan, zearalenoen. Zearalenoen is 'n natuurlike miko-estrogeen wat as gevolg van infektiewe toestande deur die Fusariumskimmel dikwels in graanvoedselsoorte gevind word. Zeranol en zearalenoen is beide β -resorsikliese suurlaktone (RALs).⁴



Figuur 3.1 Struktuur van β -resorsikliese suur laktone (RALs).⁴

Meeste van die verbindings van hierdie algemene struktuur het swak estrogeniese aktiwiteite. 'n Dubbelbinding by die C 11- en C 12- verbinding en 'n karbonielbinding by die C 7-verbinding in plaas van 'n hidroksielgroep, toon die verskil tussen 'n zeranol- en 'n zearalenoonverbinding aan.⁴



Figuur 3.2 Die vergelykende metabolisme van zeranol en zearalenoen.⁴

In vergelyking met die struktuur van zeranol, zearalenoon en RALs nie noemenswaardige invloed op die basiese molekulêre samestelling nie. 'n Baie interessante kenmerk van hierdie basiese RAL-struktuur is die relatiewe oorvleuelende ooreenkoms met estradiol. Die zeranol- en estradiolmolekule is albei 10 tot 11Å (1.0 tot 1.1nm) lank en is ook soortgelyk wat lipo-affiniteit betref. Hierdie ooreenkomste van die basiese molekuulstruktuur en polariteit verduidelik dus die affiniteit wat RALs vir die estrogenreseptore het.⁴

3.3 DIE BIOLOGIESE AKTIWITEITE VAN ZERANOL

3.3.1. Estrogeniese Aktiwiteit

Zeranol en sy metaboliet, β -zearalanol asook zearalenoon en sy hoof metaboliete α - en β -zearalenol, kompeteer almal met estradiol vir binding aan sitoplasmiese estrogenreseptore in verskeie orgaanareas, byvoorbeeld: rot-uterus, rot-mammêre klier, beeslewer, en menslike borskankerselle.⁴ Zeranol en zearalenoon het swak estrogeniese eienskappe en nes estrogen, veroorsaak dit die inhibering/blokkering van die hipotalamus en anterior hipofise, en is verantwoordelik vir atrofie van die ovaria, testes, prostaat en seminale vesikels, en het ook 'n uterotrofiese effek tot gevolg. Zeranol en zearalenoon het in studies dieselfde fisiologiese effekte in al die sisteme wat bestudeer is, getoon, naamlik 'n affiniteit vir estrogenreseptore wat mededingende verplasing van estradiol tot gevolg het.⁴

3.3.2. Fertiliteit

In 'n studie waar die fertiliteit en reproduktiwiteit van rotte bestudeer is, is gevind dat 0,3mg/kg/dag zeranol oraal toegedien, geen effek op die fertiliteit of reproduktiewe funksionaliteit van die rotte gehad het nie.²⁹ 'n Verhoogde dosis van 1,25 en 5,0mg/kg/dag het 'n verlengde aantal dae van saamwoning voor die eerste

inseminasie nodig. Hierdie v het ook 'n kleiner werpselgrootte by geboorte tot gevolg gehad, asook 'n verhoogde aantal stilgeboortes en verlaagde neonatale oorlewing.⁴

Die herhaaldelike orale toediening van zeranol aan rotte het 'n reprodktiewe geen-effek-dosis van 0,3mg/kg liggaamsmassa/dag aangedui. Fertiliteit het, na orale toediening van 10mg zearalenoen/kg liggaamsmassa/dag, betekenisvol afgeneem. 'n Verhoogde voorkoms van stilgeboortes is al op 'n dosis van 1mg/kg liggaamsmassa/dag waargeneem. Die reprodktiewe geen-effek-dosis van zearalenoen was dus tussen 0,1 en 1,0mg/kg/dag.³⁰

3.3.3. Teratogenisiteit

Studies om die teratogenisiteit van zeranol en zearalenoen te bepaal, is al op muis, rotte en konyne uitgevoer. Die fetale lewensvatbaarheid is beïnvloed wanneer subkutane toedienings van zeranol, vanaf dag 10 tot dat 16 van dragtigheid, teen 'n dosis van groter as 300mg/kg liggaamsmassa/dag toegedien is.³¹ Indien zeranol oraal aan rotte toegedien is, met dosisse van 0,2 en 6mg/kg liggaamsmassa/dag vanaf dag 6 tot 15 van dragtigheid, het die aantal lewende fetusse afgeneem en het verhoogde fetale resorpsie in albei groepe plaasgevind.²⁹ In die geval waar orale toedienings van dosisse van 0,1 en 5mg/kg liggaamsmassa/dag zeranol aan konyne vanaf dag 6 tot 18 van dragtigheid gegee is, is geen betekenisvolle verskille met betrekking tot bevrugting, werpselgrootte, fetusgrootte of beenlengte waargeneem nie. In nie een van hierdie studies of in 'n 3-generasie-rotstudie met zeranol was daar geen indikasie van teratogeniese effekte nie.²⁹ 'n Zearalenoondosis van 0,3 tot 1,0mg/kg liggaamsmassa/dag is in teratologiestudies op rotte as die geen-effek-dosis aangeteken.³² Hidy (1977) het egter 'n effens hoër geen-effek-dosis aangegee,

naamlik 1,0 tot 3,0mg/kg liggaamsmassa/dag. 'n Effens hoër dosis toon wel vertraagde skeletossifikasie.³³

In studies waar rotte aan 10mg/kg liggaamsmassa/dag zearalenoen blootgestel was, het die nageslag 'n betekenisvolle verhoogde insidensie van skeletabnormaliteite getoon. Die vertraagde ossifikasie wat gevind is, is moontlik as gevolg van geïnhibeerde fetale ontwikkeling wees, eerder as suiwer misvorming.³⁰

3.3.4. Genotoksiese Aktiwiteit van β -Resorsikliese Suurlaktone (RALs)

Zeranol en zearalenoen het negatiewe data-uitkoms getoon met onder meer *Bacillus subtilis* rec- en *Salmonella typhimurium*-toetse. Mutageniese toetse het dus bewys dat RALs nie genotoksies is nie. Tydens 'n DNA-bindingstudie is gevind dat 17β -estradiol se binding aan DNA sewevoudig meer is as die zeranolvlakke; maar albei verbindingstowwe het 'n lae bindingskapasiteit in vergelyking met bekende genotoksiese karsinogene.⁴

3.3.5. Karsinogenisiteit

In 1968 is 'n karsinogenisiteitstudie van zeranol op rotte se hele lewensduur gedoen. Geen bewyse kon gevind word wat enige karsinogeniese effekte staaf nie, maar hierdie studie kan nie regtig vergelyk word met hedendaagse moderne standaarde vir karsinogenisiteitstoetse nie. Geringe endokrien geassosieerde veranderinge is egter in sommige organe waargeneem, sowel as nodulêre hiperplastiese letsels in die lewer. Endometriële veranderinge is ook by 'n hond en 'n resus aap gevind na langtermyn studies waar onderskeidelik 0,15 en 37,5mg/kg liggaamsmassa/dag en 0,15 en 75mg/kg liggaamsmassa/dag zeranol oraal toegedien is. Hierdie veranderinge wat gevind is, is toe te skryf aan die estrogeniese eienskappe van zeranol. Geen karsinogeniese effekte is na blootstelling aan zeranol vir periodes van

onderskeidelik 7 en 10 jaar by ³⁴ gevind nie. Tydens 'n 2 jaar *in utero* karsinogenisiteitstudie van zearalenoen op rotte is ook geen tumorgeniese effekte gevind nie. Zearalenoen het wel proporsioneel hipofisêre en hepatosellulêre adenomas in die B6C3F1 muise aangetoon. Hierdie muise het 'n agtergrondgeskiedenis van 'n 3 tot 4% verhoogde insidensie van hierdie letsels en die verhoogde voorkoms van sulke letsels is ook waargeneem waar muise aan lae dosisse van estradiol en estroon intraperitoniaal blootgestel was.⁴

3.4 MOONTLIKE BELANG VAN ZERANOL OORBLYFSELS

Die vraag wat gestel word, is: is die oorblyfsels van zeranol wat in vleis gevind word van enige noemenswaardige belang in vergelyking met lae vlakke van ander RALs wat natuurlik in voedsel voorkom?

3.4.1. Inname van RALs in die dieet

Janski (1983) het die potensieële daaglikse inname van zeranol en sy metaboliete, gebaseer op vlakke van zeranol en metaboliete wat voorkom in vleis na inplantings, en vasgestel as <200ng/kg vleis.³⁵

Mense word hoofsaaklik aan zearalenoen en sy metaboliete blootgestel deur direkte inname van graanprodukte. Inname van graanprodukte deur plaasdiere lei ook indirek tot zearalenoen, α - en β -zearalenolneerslae in vleis, melk en eiers. Indien die gemiddelde menslike inname van graanprodukte 250g/dag is, waarvan die berekende konsentrasie zearalenoen wat natuurlik in graan voorkom, 20 μ g/kg is, is dit moontlik dat verbruikers blootgestel word aan 5 μ g (5000 ng) zearalenoen/dag, vleis, melk en eiers uitgesluit.⁴

Min data is bekend oor die zearalenoenvlakke in diereprodukte wat in die kleinhandel verkoop word. Na afloop van gekontroleerde voedingstudies, word aangeneem dat

'n gemiddeld van 50g vleis-konsentrasie van 200ng/dag deur verbruikers in die Verenigde Koningryk verbruik word. Verdere blootstelling as gevolg van 'n gemiddelde melkverbruik van 0,5 liter/dag, waarvan die konsentrasie in melk as 4µg/kg is, gee 'n inname van 2µg. Die totale beraamde menslike blootstelling aan RALs in voedsel wissel tussen 5200ng/dag (graanprodukte en vleisinname) tot 7000ng/dag (graanprodukte, vleis en melk).⁴

3.4.2. Geen-meetbare-effek-vlakke

Die effekte wat zearalenoomblootstelling het, regverdig dat die geen-meetbare-effek-vlak in aanmerking geneem behoort te word. Die vaginale kornifikasie-indeks van die gekastreerde vroulike *cynomolgus*-aap is die mees sensitiewe indikator vir estrogeniese effekte en is as model gebruik om die hormonale geen-effek-vlak van zeranol (0,05mg zeranol/kg liggaamsmassa/dag) te bepaal.³⁶ Indien zeranol en zearalenoomblootstelling vergelyk word, is die ooreenkoms wat metabolisme en biologiese effekte betref, feitlik dieselfde. Dus sal die geen-effek-vlak wat vir zeranol bereken is, nie merkbaar verskil van zearalenoomblootstelling in ander spesies nie.⁴ Na afloop van twee langtermynstudies op rotte is die geen-effek-vlak van zearalenoomblootstelling as tussen 0,1 en 1,0mg/kg liggaamsmassa/dag bepaal.³⁰

3.4.3. Risikobepaling

Die daaglikse inname van zearalenoomblootstelling deur middel van melk, eiers en vleisprodukte van diere wat nie hormonale implantings ontvang het nie, is tussen 5200 en 7000ng. Die daaglikse inname van zeranol deur middel van vleisprodukte wat wel hormonale implantings gehad het, is <10 tot <100ng. Indien bogenoemde met mekaar vergelyk word, word aangetoon dat die gebruik van zeranol as anaboliese stimulant nie 'n betekenisvolle bydrae tot potensiële daaglikse menslike inname van RALs het nie.⁴

Gebaseer op 'n hormonale c₅₀ van 0,5mg/kg liggaamsmassa/dag vir zeranol, is die geen-effek-vlak van RALs vir 'n 70kg volwassene 3500µg/dag. Daar is dus 'n veiligheidskeidslyn van >500-voudig voordat hormonale effekte waargeneem sou word indien daar beide zeranol- en zearalenoomblootstelling in die diëet was. Indien die blootstelling slegs aan zeranol was, sou daar 'n > 35000-voudige veiligheidsgrens wees.⁴

3.4.4. Veiligheid van Hormoonstimulante

Groeistimulante wat estrogeen bevat is voordelig vir die veebedryf in die landbou en word as veilig vir menslike gebruik beskou.³⁷ Jarelange proewe is in Amerika uitgevoer om die hormoonvlakke in voedselprodukte te bepaal. Die resultate wat in 1991 deur die taakspan van die Wêreldgesondheidsorganisasie (WGO) bevestig is, het die hoeveelheid estrogeen in verskillende voedselsoorte soos volg weergegee:

(Estrogeenvlak in nanogram gemeet)

- Beesvleis (geen implantaat) = 1,3
- Beesvleis (implantaat) = 1,9
- Melk = 11,0
- Aartappels = 225,0
- Kool = 2000,0
- Koringkiem = 3400,0
- Sojaboonolie = 1680 000,0
- Moedersmelk = 760,0 asook

- Bier wat 10 keer meer as die normale hormoonvlak van beesvleis.³⁸

Om die veiligheid van groeistimulante te verseker word groeistimulante in samewerking met 'n veearts in 'n stimulasieprogram beplan en gebruik. Faktore wat die tipe en inplantingsdosis bepaal, sluit in: die kwaliteit vleis (graad, karkasgewig) wat verlang word; geslag van die dier; die ras; die spesie; ouderdom en aanvangsmassa van die voerdier, asook die tipe rantsoen wat gevoer word.³⁸

3.5 GEVOLGTREKKING

Groeipromotorinplantate wat hoofsaaklik uit zeranol, zearalenoen asook hulle hoofmetaboliete bestaan, het feitlik dieselfde chemiese struktuur en werking, naamlik estrogenies. Infertiliteit, teratogenisiteit, genotoksisiteit en karsinogenisiteit is al deur middel van dierestudies bevestig. Die inname van RALs in die dieet en die geenmeetbare-effekvlak is ook bestudeer om sodoende die moontlike risiko's vir menslike veiligheid te bepaal.

ENDOKRINOLOGIE VAN DIE MUISMODEL

4.1 INLEIDING

Endokriene klieren en hul sekretoriese produkte vervul 'n belangrike rol in 'n organisme deur die modulering van sistemiese funksies en reaksies om interne en eksterne verandering teweeg te bring. Die aksie en reaksie as gevolg van hierdie sekretoriese produkte (hormone) word in terme van die frekwensie en halfleeftyd gemeet wat verskil van die meting van ander sisteme soos o.a. die senuweestelsel. Hormone word in klein hoeveelhede vrygestel maar veroorsaak omvangryke reaksies in die teikenorgaan deur middel van verhoogde spesifieke en algehele sellulêre metabolisme. Deur die jare is die muis deeglik bestudeer vir spesie-spesifieke endokriene fisiologie, asook as model vir probleme in soogdierendokrinologie.

4.2 HIPOFISE

4.2.1. Anterior Lob

Hierdie lob bevat die meeste selteipes en is deur jare se navorsing intensief bestudeer. Ten minste vyf tipes selle is deur middel van hul hormoonprodukte geïdentifiseer in die anterior lob: groeihormoon (GH), prolaktien (PRL), adrenokortikotrope hormoon (AKTH), tiroïedstimulerende hormoon (TSH) en die gonadotropiene hormone, luteïniserende hormoon (LH) en follikel stimulerende hormoon (FSH). Buiten die AKTH-selle wil dit voorkom of die muishipofise ook endorfiene en moontlik lipotropien bevat.

Die FSH- en LH-sekretierende selle (gonadotrope) wat polihidraal en sferoïdaal in spesifieke areas geleë is, het min of meer dieselfde verspreiding, maar is

gekonsentreerd in die rostrale hipofise - die sogenaamde “seksone”. Hormone wat deur die verskillende seltypes afgeskei word, word in granules in die sitoplasma vervoer. Granules wat van die anterior hipofise hormone (AKTH, LH en FSH) bevat, is kleiner as dié wat GH en PRL bevat. Gonadotrope is groter en moontlik meer in aantal in die mannetjie- as in die wyfiemuis.³⁹

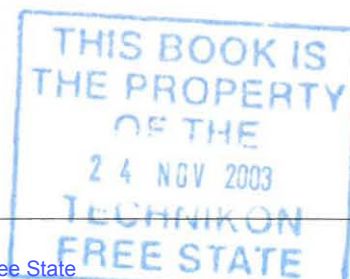
4.2.2. Biochemiese Struktuur van die Hipofise hormone: TSH, FSH, LH

TSH-, FSH- en LH-molekules is ook struktureel dieselfde: glukoproteïenmolekules met 'n molekulêre massa van ± 28000 tot 29000 wat elkeen een α -subeenheid en een β -subeenheid bevat waaraan klein koolhidraathelftes gebind is. Hierdie α - en β -subeenhede is intern verbind met disulfiedverbindinge, maar het op hul eie geen biologiese aktiwiteit nie. 'n Hidrofobiese binding is weer verantwoordelik vir die α - β -dimeerbinding. In die muismodel wil dit voorkom of die α -subeenhede van TSH, FSH en LH dieselfde is, maar die β -subeenhede verskil vir elke hormoon. Die α -subeenhede van muis is immunologies dieselfde as dié van rotte maar duidelik verskillend van mense, terwyl die β -subeenhede van verskeie spesies 'n sekere aantal kruisreaktiwiteit aandui.³⁹

4.2.3. Beheer van die Hipofise hormone

Die konsentrasie van die hipofise hormone in die sirkulasie word gekontroleer deur:

- hipotalamiese peptiede en katekolamiede wat die hormoonvrystelling induseer of inhibeer of
- deur endokriene hormone wat 'n positiewe of negatiewe terugvoering na die hipotalamus of hipofise tot gevolg het.



In die eenvoudigste geval (uitsonderings) stimuleer 'n klein hipotalamiese peptied die vrystelling van 'n hipofise hormoon. Die hormoon van die hipofise stimuleer weer op sy beurt 'n enkele teikenklier en 'n chemiese produk van hierdie teikenklier veroorsaak 'n terugvoerende kontrole na die hipofise of hipotalamus. Negatiewe terugvoer kan gedefinieer word as: Indien die teikenklier voldoende gestimuleer is, vertraag die teikenklierproduk die hipofise en hipotalamus se hormoonvrystelling.

Tydens positiewe terugvoer verhoog die teikenklierproduk hierdie hormoonvrystelling indien die teikenklier nie optimaal gestimuleer is nie. In die meeste gevalle is die negatiewe terugvoeraksie die oorheersende metode van kontrole.³⁹

4.2.4. Follikel stimulerende en Luteïniserende hormone

In die muismodel het die gonadotropiene, FSH en LH, twee tipes hipotalamiese kontrole sisteme – een wat die hormoonvlakke beheer gedurende die estrussiklus en die tweede sisteem wat die hormonale vlakke onder basale omstandighede beheer. Die anterior hipotalamiese sentrum is in beheer van die tydstip van gonadotropienvrystelling en die meer mediale hipotalamiese sentrum is vir die vrystelling van GnVH verantwoordelik. Steroïedhormone afkomstig vanaf die gonades veroorsaak ook dan positiewe en negatiewe terugvoerkontroles met betrekking tot bogenoemde sentrums, asook die pituitêre gonadotropiene. Verskeie omgewingsfaktore kan 'n effek op die basale gonadotropienvlakke van beide wyfie- en mannetjiemuise hê.³⁹

4.2.5. Ontogenie en Senessensie

Hormone vanaf die anterior hipofise kan reeds verskeie dae voor geboorte in verskillende seltipes onderskei word. Vanaf dag 15 van dragtigheid kan 1 of 2 granules in hipofisêre selle teenwoordig wees. Op dag 17 mag selle met

GH selle verskyn. Teen hierdie tyd is die hipofisêre vervoersisteem reeds anatomies volledig en GnVH kan in die neuronale aksons waargeneem word. Hipofisêre funksie (LH-afskeiding) kan op dag 17 tot 18 van muis fetusse se hipofises in kulture bewys word en kan dus testosteroonvrystelling stimuleer.⁴⁰

Hoewel die anterior hipofise met geboorte reeds teenwoordig is en daar bewyse is van basale sekresie, is die ontwikkelingspatrone van sekresies van spesifieke hormone redelik verskillend. Navorsing het getoon dat hierdie ontwikkelingspatrone piekperiodes van aktiwiteit vir elke spesifieke anterior hipofise hormoon grafies aandui (sirkulerende hormoonvlak teenoor ouderdom). Die belang van hierdie hormoonpieke is nie altyd duidelik nie. Die eerste hormoonpiek in beide rotte en muis is dié van GH.³⁹

Die hormonale aktiwiteitspieke sluit TSH, LH en FSH in en geskied gedurende die tweede en derde week van lewe. Spesifiek in die CF-1-tipe muis, piek FSH en LH beide op dag 10. Hierdie hormonale aktiwiteit kan moontlik die maturasie van vroulike muis se ovariële follikel- en manlike muis se testikulêre ontwikkeling tot gevolg hê, hoewel die gonadotropienontwikkelingspatrone eers op later ouderdom plaasvind. Piek FSH- en LH-vlakke word eers 2 tot 3 weke voor puberteit in muis (ongeveer dag 30) waargeneem, waarna 'n geringe daling tot en met volwassenheid plaasvind.³⁹ Dit wil voorkom of hierdie daling plaasvind met die verhoging van testosteroonproduksie en mag wees as gevolg van 'n verhoogde effektiewe negatiewe terugvoercontrole van gonadotropiene wat na puberteit vestig. Hierdie prepuberteits gonadotropienpieke is moontlik belangrik vir testikulêre groei (FSH) en Leydigsel maturasie (LH). PRL is nog 'n belangrike hipofisehormoon vir manlike muis maturasie. 'n Vroeë PRL-piek in die Swiss albinomuis word tussen dag 35 tot 40 waargeneem.⁴² Hierdie aansienlike styging van PRL val saam met versnelde

groeï van die bykomende **rostaat**, **seminale vesikels**, **bulbo-uretralekliere**) voordat **testosteroon** vlakke hul piek waarde bereik het. 'n Vroeë prepuberteitstyging van **LH** in manlike muis het 'n klein styging in **testosteroon** op dag 30 tot gevolg.⁴² Hierdie **testosteroon**styging het weer **PRL**-vrystelling, asook **testikulêre PRL**-binding tot gevolg. **PRL** hou weer **LH**-reseptors op die testis in stand. **PRL**'e se rol in manlike muis is beslis van belang deurdat daar bewys is dat **PRL** fertiliteit in dwergmuis met **PRL** tekort, herstel het.⁴³

4.2.6. Hipotalamiese Defekte

Op hipotalamiese vlak is meting van die konsentrasie van die vrystellingshormoon die mees direkte metode om die hoeveelheid van die ooreenstemmende anterior hipofisehormoon te kan vasstel. Die vrystellingshormone vir **TSH**, **AKTH** en die gonadotropiene (**GnVH**) asook die inhiberingshormone vir **GH** (**somatostatien**) is chemies geïdentifiseer en kan met die uitsondering van **AKTH**, deur middel van radioïmmunisering (**RIE**) getoets word.⁴⁴

4.3 TESTIS

4.3.1. Beskrywende Anatomie

Die volwasse manlike muis se testes word as gepaarde strukture in die posterior abdominale holte (of in die skrotale sak) aan weerskante van die blaas aangetref. Die tunica albuginea is die sterk buitenste kapsel wat elke testis omsluit. Die testis bestaan uit tot 2m van seminifereuse tubuli wat die Sertoliselle huisves. Sertoliselle bevat spermatogonia in verskillende stadia van spermatogenese. Tussen die gekronkelde seminifereuse tubuli is interstisiële (**Leydig**) selle wat primêr vir androgeenproduksie verantwoordelik is. Aan die buitekant van die tunica waar van die tubuli parallel uitloop (**rete testis**) word die kop, middelstuk en stert van die

epididimus gevorm. Die spei le maturasie en storing vind in die epididimus plaas, waarna dit tydens ejakulasie vanuit die koudale epididimus deur die vas deferens na die uretra deurgevoer word.³⁹

Die sitologie van die testis sluit die verskillende morfologiese seltipes in wat van primitiewe kiemselle (gonosiete) ontwikkel tot spermatogonia. Spermatogonia differensieer stapsgewys tot volwasse spermatosoë. Hierdie reeks van stapsgewyse omvorming van hierdie selle sluit die volgende in:

- 'n proliferatiewe fase waar spermatogonia verdeling ondergaan om te vermeerder;
- 'n differensiasiefase wanneer die kiemselle deur verskillende stadia van spermatogonia gaan om intermediêre spermatogonia, primêre spermatosiete, sekondêre spermatosiete, spermatiede en uiteindelik spermatosoë te vorm.

Kiemselle is ingebed in Sertolisellae met die doel om hierdie ontwikkelende kiemselle te ondersteun en in 'n later stadium te omring. In die muismodel neem die ontwikkeling van kiemselle tot volwasse spermatosoë 34,5 dae.³⁹

4.3.2. Steroïedhormone van die Testes

Soos reeds beskryf, is spermatogenese die hoofdoel van die testes. Produksie van drie hoofgroepe hormone (testosteroon, Mülleriaanse inhiëeringsfaktor (MIF), en inhibien) is addisioneel tot spermatogenese.

Testosteroon is die hoof steroïedhormoon wat deur die Leydigselle aan die begin van dag 13 tot 14 van dragtigheid in die fetus geproduseer word. MIF en inhibien is proteïenhormone wat afsonderlik bespreek sal word.^{40,45}

Die biosintetiese proses wat lei tot die produksie van testosteroon vind in verskeie areas van die liggaam plaas.⁴⁶ Sitoplasma van die lewer is primêr die area waar asetate na cholesterol omgeskakel word. Die tweede reeks stappe vind in die mitochondria van die Leydigsele plaas waar cholesterol omgeskakel word na pregnenoloon. Die omskakeling van pregnenoloon na testosteroon is die derde reeks van stappe en vind in die gladde endoplasmiese retikulum van die Leydigsele plaas.

Die omskakeling van pregnenoloon na testosteroon mag deur middel van twee verskillende weë plaasvind wat by of pregnenoloon of progesteron begin. Die finale omskakeling stap is die omskakeling van 5-androsteendiol na testosteroon.

Testosteroon kan ook verder gemetaboliseer word deur middel van die aromatisering van estradiol in die brein, of deur reduksiereaksie na dihidrotestosteroon in die manlike reprodutiewe buis. Addisioneel hieraan mag testosteroon en ander adrenale steroïede omgeskakel word na 17β -ketosteroïede wat weer deur die lewer na glukoroniede of sulfate omgeskakel word en later in uriene uitgeskei word.³⁹

4.3.4. Hormoonfunksies

Testosteroon en sy aktiewe metaboliete beoefen hulle aksies deur selle direk in te dring, te kombineer met spesifieke sitosolreseptore, die kern binne te dring, te bind aan die kernchromatien en te veroorsaak dat gedeeltes van die genetiese boodskap herskryf word.⁴⁷ Proteïensintese van boodskapper RNA is die gevolg van hierdie genetiese boodskapherskrywing en het 'n spesifieke aksie op die teikenorgaan tot gevolg. Die reaksie in sommige gevalle, is DNA-duplisering van die fetale manlike reprodutiewe stelsel.³⁹

Die verskillende tipes asook die spesifieke aktiewe androgeenmetaboliet bepaal die hoof aksies van testosteroon. Voorbeelde hiervan is die volwasse manlike reprodutiewe stelsel wat vanuit die Wolff-liggaam (epididimis, vas deferens, prostaat en seminale vesikels), die drie seksuele dimorfiese organe (nier, submaksillêre kliere en prepusiële kliere), die brein en spierweefsel ontstaan het.³⁹

- Manlike reprodutiewe stelsel

Die ontwikkeling van die manlike reprodutiewe stelsel is van testosteroonproduksie deur die testis, en die respons van die Wolffiaanse buis op testosteroonomskakeling (5 α -dehidrotestosteroon, DHT) afhanklik. DHT werk in op die Wolffiaanse buis wat uit differensiasie van die epididimus, vas deferens, seminale vesikels, bulbo-uretraleklier, en prostaat ontstaan.⁴⁸ Die afhanklikheid van volwasse manlike sekondêre reprodutiewe strukture van androgene word deur middel van voorbeelde verduidelik deur reaksie van die seminale vesikels en massabepalings van bulbo-uretralekliere van gekastreerde modelle na afloop van testosteroonbehandelings.⁴⁹

- Submaksillêre kliere en niere

Testosteroon induseer die sintese van verskeie proteases,^{50,51} 'n beginsel soortgelyk aan renien,⁵² 'n senuweegroefaktor,⁵³ asook epidermale groeifaktore (oogopening en tandontwikkeling).⁵⁴ Hierdie ontwikkeling vind onder die invloed van testosteroon in kombinasie met tiroksien en kortikosteroon plaas om maksimale submaksillêre groei te verseker.⁵⁵

Ook in die niere induseer testosteroon die ontwikkeling van verskeie proteïene.⁵⁶ Genetiese reguleringsmeganismes is geïdentifiseer asook die sinergistiese afhanklikheid op testosteroon en hipofisêre afskeidings.³⁹

- Brein

Testisfunksie met betrekking tot gedrag is twee keer ter sprake in die lewe van manlike muis: (1) neonatale kritieke periode wanneer sekere manlike gedragspatrone onder invloed van testosteroon in die brein vasgelê word; en (2) 'n periode in die volwasse lewe wanneer hierdie manlike gedrag ontlok word as 'n respons op testosteroonafskeiding.³⁹ Die vasleggingsproses is as gevolg van of testosteroon, testosteroon aromatisering na estrogeen in die breinselle, of beide estrogeen en DHT (5 α -dehidrotestosteroon).⁵⁷ Oor die algemeen is daar voldoende bewys van 'n korrelasie tussen testosteroon en agonistiese gedrag.³⁹

- Spierweefsel

Androgeenreseptors in spierweefsel is die tussengangers waardeur die algehele verhoogde groei van manlike muis in vergelyking met wyfies plaasvind.³⁹

4.3 HORMONALE BEHEER VAN TESTIKULÊRE FUNKSIE

Testikulêre funksie is in beheer van die produksie van hormone (testosteroon, inhibien, en MIF) waarvan die teikenorgane buite die testes voorkom. Dit hanteer ook die produksie en oordrag van hormone en produkte in die testes, sodat die hoof funksie van die testes, nl spermatogenese, kan plaasvind.³⁹

- LH en testosteroon

LH vrystelling het 'n positiewe invloed op testosteroonvrystelling vanaf die Leydigsele – verhoogde LH-vrystelling het verhoogde testosteroonsintese en vrystelling tot gevolg. Indien die LH-vlakke onvoldoende is, is die testosteroonvlakke ook laag. Spesifiek in C57BL/10J muis is die LH en testosteroon-serumvlakke relatief laag en die spesie word ook gekenmerk deur kleiner testes.³⁹

Twee algemene eksterne faktore wat die testosteroon beïnvloed, is alkohol en marijuana. Studies op sulke muismodelle het getoon dat alkohol 'n direkte effek op testosteroonsintese het, as gevolg van die alkoholmetaboliet, aetaldehyd ⁵⁹; terwyl bestanddele van marijuana moontlik testosteroon beïnvloed deur LH-vrystelling te inhibeer. ⁶⁰

- Ander hipofisehormone

Ander hormone soos LH, FSH en PRL, bykomend tot testosteroon, is noodsaaklik vir voldoende produksie van spermatozoë. Soos reeds genoem is LH die hipofise reguleerder van testosteroon – testosteroon is 'n onontbeerlike hormoon vir spermatogenese. FSH inisieer vermeerdering van spermatogonia en Sertoliselle in die prepubertale muis en veroorsaak verhoogde proteïensintese in alle testikulêre selle van volwasse muis. FSH se primêre funksie is om vroeë spermatogenese te inisieer en is nie noodsaaklik in latere stadia nie. ⁶¹

FSH is ook belangrik as stimulator vir die produksie van androgeen-bindingsproteïen by die Sertoliselle. Androgeenbindingsproteïen se funksie is die vervoer van androgeen tussen Sertoliselle, asook die opname van androgeen deur die Sertolikiemselle wat differensiasie ondergaan. Spermatogenese kan dus nie voltooi word sonder androgeen as bron nie. ⁶²

4.4 GEVOLGTREKKING

'n Breedvoerige uiteensetting van die normale endokrinologie van die muis word in hierdie hoofstuk weergegee. Endokrinologiese agtergrond is belangrik om die moontlike effek van die toetsstof te verklaar. Die muis as model is deur jare se navorsing deeglik bestudeer en as geskikte model bevind om hierdie studie se resultate te kan evalueer en moontlik op die mens van toepassing te kan maak.

METODIEK

5.1 INLEIDING

Studies waar die moontlike invloed van estrogeenblootstelling op proefdiere gedoen is, is hoofsaaklik op dragtige vroulike diere uitgevoer. Die manlike nageslag van hierdie estrogeen blootgestelde wyfies is ondersoek vir enige nowe-effekte.^{5,48} Studies waar van estrogeniese implantate gebruik gemaak is, is op bulle uitgevoer waarna groeitempo, karkasmassa, testisgrootte en gedrag onder die soeklig gekom het.^{7,64,65} Waar muise of rotte as proefdiere gebruik is, kan toediening van toetsstowwe subkutaan, intraperitoniaal of oraal gedoen word.^{4,5,66}

Intraperitoniale toediening is as toedieningsroete vir hierdie studie geïdentifiseer aangesien dit meer prakties uitvoerbaar is, die dosis en toedieningstyd streng nagevolg kan word, en die muise voor toediening gereeld geweeg kan word.

Muise is onder toesig van die proefdiersentrum van die Universiteit van die Vrystaat gehuisves. Die Proefdiersentrum verseker dus dat die omgewing en voeding 'n konstante faktor is en nie die studieresultate sal beïnvloed nie. Alle evaluasies is deur dieselfde twee navorsers uitgevoer en genoteer.

5.2 STUDIEPROSEDURES

- Blootstelling van muise aan zeranol op vasgestelde ouderdomme met 'n vasgestelde dosis en vir 'n spesifieke tydspanne (48-uurliks vir 5 weke) Al die

muis (N=60) word op 8 weke ouderdom opgeoffer om die studiemateriaal (testisweefsel en epididimisaspiraats) te verkry.

- Testis massabepalings en semenevaluasie op epididimisaspiraats.
- Ligmikroskopiese evaluasies van testissnitte.⁶⁷
- Elektronmikroskopiese evaluasie van spermatozoösnitte.

5.3 FARMAKOLOGIESE BEPLANNING

Loodsstudie: Dosering 150 µg/kg zeranol (Muisgroep 1 N=5)

Dosisaanpassings: Dosering 2 mg/kg zeranol (Muisgroepe 2, 3 en 4, N=15).

5.3.1. Loodsstudie: Muistoetsgroep 1

Toets 1: Muis (N=5) 3 weke ouderdom. Eenmalige toediening van 150 µg/kg zeranol, gevolg deur daaglikse toediening plasebo tot en met 8 weke ouderdom.

Kontrole 1: Muis (N=5) 3 weke ouderdom. Daaglikse plasebo toediening vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom.

Toets 2: Muis (N=5) vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, herhaaldelike zeranoltoedienings (150 µg/kg) 48-uurliks.

Kontrole 2: Muis (N=5) vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, herhaaldelike 48-uurlikse plasebotoedienings.

Alle toedienings is intraperitoniaal gedoen en al die muis word op 8 weke ouderdom geoffer.

Massabepalings is elke tweede dag genoteer.

Verdere literatuurstudie het (Central University of Technology, Free State) die geen-effek-vlak van zeranol op volwasse muis tussen 0,1 tot 1,0 mg/kg/dag is.⁴ Aansoek om 'n dosisaanpassing te maak, is by die Beheer Komitee vir Proefdier eksperimente ingehandig en goedkeuring is ontvang (22 Augustus, 2000).

5.3.2. Dosisaanpassing

Muisgroepe 2, 3 en 4 is met dié dosisaanpassing behandel:

Toets 1: Muis 3 (N=20) weke ouderdom, eenmalige toediening van 2 mg/kg zeranol gevolg deur daaglikse toediening plasebo tot en met 8 weke ouderdom.

Kontrole 1: Muis (N=20) 3 weke ouderdom, daaglikse plasebotoediening vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom.

Toets 2: Muis (N=20) vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, herhaaldelike zeranoltoedienings (2 mg/kg) 48-uurliks.

Kontrole 2: Muis (N=20) vanaf 3 weke ouderdom tot en met 8 weke ouderdom, herhaaldelike 48-uurlikse plasebotoedienings.

Alle toedienings word intraperitoniaal gedoen en al die muis word op 8 weke ouderdom geoffer.

5.4 LABORATORIUMPROSEDURE VIR SEMENANALISE

Testes is deur middel van disseksie verwyder, en in embriovriendelike weefselkultuurbakkies (Falcon 3004) met 1,0ml Ham F10-kultuurmedium geplaas. Alle testis monsters is by 5% CO₂, 98% humiditeit en temperatuur van 36°C geberg. Massabepaling (gram) is met behulp van 'n Mettler AE100 laboratoriumskaal uitgevoer. Die massas is genoteer.

Die epididimusgedeelte en die kaar geskei waarna die testisgedeelte in 10 ml, 95% formalien bewaar is. Testismonsters is na die Departement Anatomiese Patologie geneem vir histologiese voorbereiding en mikroskopiese evaluasie.⁸

Die epididimus is in 1,0ml Ham F10-kultuurmedium gedissekteer om die inhoud uit te "was". Druppels van 10 µl is gebruik om vars preparate vir semenevaluasie te berei. Semenevaluasie is uitgevoer volgens die Wêreldgesondheidsorganisasie (WGO) se 1990 Laboratoriumhandleiding. Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$) en kwalitatiewe en kwantitatiewe motiliteit is mikroskopies, by 400 x vergroting, bepaal. Resultate is genoteer.

5.5 ELEKTRONMIKROSKOPIESE MONSTERVOORBEREIDING

Spermmonsters van 0,5 ml is in 2,5% Sörenson se fosfaatgebufferde glutaraldehyd, pH 7,2 gefikseer en oornag by 4°C bewaar. Die spermsuspensie is in 'n koniese BEEM 00-politeenbuisie oorgeplaas en vir 3 minute by 500g gesentrifugeer om 'n sagte neerslag te vorm. Die supernatant is stadig afgegooi, met die volgende oplossing vervang en die sperme is versigtig gehersuspendeer. Hierdie prosedure is gedoen na elke stap van prosessering.

Na die primêre fiksering in glutaraldehyd is die spermsuspensie twee keer vir 10 minute elk uitgewas in Sörenson se fosfaatbuffer voordat dit in Palade se veronalasetaatgebufferde osmiumtetroksiode vir 60 minute gefikseer is. Dehidrasie is vir 10 minute in 70% asetoon, 10 minute in 95% asetoon en 2 keer van 10 minute elk in 100% asetoon uitgevoer. Die spermsuspensie is met 100% asetoon en Spurr se epoksieresin, 1:1 verdunning, vir 90 minute by kamertemperatuur, suiwer resin vir 60 minute (30 minute kamertemperatuur en 30 minute by 50°C) en 'n tweede suiwer resinruiling vir 60 minute by 50°C versadig.

Die sperm neerslag is in BEE Spurr resin ingebed. Polymerisering was uitgevoer vir 8 ure by 70°C. Ultradun snitte van 80 nm is met behulp van 'n Reichert Ultramikrotoom gesny en op 'n koperrooster geplaas om te droog. Snitte is vir 20 minute met uranielasetaat en 5 minute met loodsitraat gekleur. Die sperme is in 'n Philips Tecnai 10-transmissie-elektronmikroskoop met Megaview II digitale kamera by 60kv geëvalueer.^{67,68,69,70,71}

5.6 MORFOLOGIESE EVALUERING VAN SERTOLISELLE, LEYDIGSELLE EN SPERMATOGONIALE STAMSELLE

5.6.1. Histologie

Na langtermyn estrogeenbehandeling het verskillende testismonsters 'n uniforme ooreenkoms getoon. In plaas van seminiferi tubuli is daar seminiferikoorde met opsigtelik klein deursnee (70 tot 90 μm) wat slegs twee seltipes huisves: spermatogonia en Sertoliselle. Die lamina propria was oormatig verdik hoofsaaklik as gevolg van die akkumulasie van kolageenmateriaal onderliggend tot die basale lamina. Die basale lamina self, as gevolg van retikulum met anastomotiese lae, het 'n golwende voorkoms gehad.

In vergelyking met die normale histologiese ondersoek is die area wat gewoonlik interstisiële weefsel bevat, heelwat vergroot. Slegs fibroblaste en versamelings klein selle wat donker granules bevat, was teenwoordig. Tipiese Leydigselle het ontbreek. Selversamelings ("clusters") en bloedvate is gewoonlik omring deur dik lamellae of kollageenfibrille. Met volgehoue estrogeenbehandeling het die aantal seminiferikoorde verminder, die spermatogonia verdwyn en die koorde self kleiner geword. 'n Verhoogde aantal makrofage is in die omliggende weefsel en tussen die Sertoliselle in die koorde aangetref. Na 10 jaar van estrogeenbehandeling bestaan

die testikulêre weefsel hoof hele gehialiseerde (albumienagtige) seminifereusekoorde.⁸

5.6.2. Sitologie van Spermatogonia

In al die weefselmonsters wat geëvalueer is, bestaan die kiemselfpopulasie slegs uit spermatogonia in die onderliggende basale lamina en ook in die middel van die koorde. Feitlik alle selle is ligte, bleek A-tipe spermatogonia aangesien donker A-tipe spermatogonia van die epiteliem afwesig is.

Die oorblywende ("persisting") spermatogonia is dikwels geïsoleerd geleë en toon ronde of ovaalvormige kerne, soms tot 4 kerne en, chromatien wat homogeen verspreid is. Die Golgi-apparaat is ook net gedeeltelik ontwikkel. Organelle is dikwels rondom die kern gekonsentreerd sodat groot areas van die sitoplasma leemtes vorm waar organelle afwesig is.

Buiten die tipiese bleek tipe A spermatogonia wat teenwoordig was, was daar ook ander wisselvorme waarneembaar. Hulle verskil van die selle soos hierbo beskryf, deurdat die chromatien heterogeen versprei is. Wat baie opmerklik is, is die voorkoms van verskeie meerkernige spermatogonia.⁸

5.6.3. Sitologie van Sertoliselle

Sertoliselle in die seminifereuse koorde van behandelde pasiënte is langer, slanker selle wat lateraal en apikaal aan mekaar verbind is. Hulle het opvallende ronde of ovaalvormige kerne, soms binukliêr. 'n Meerderheid van die kerne het digte, homogeen verspreide chromatien en klein kerne wat aan die kernmembraan geheg is. Minder digte en groter kerne kom ook voor. Die kerne se chromatien kom minder gekondenseerd voor met vergrote deurskynende inter-chromatiese ruimtes. Verder

bevat hierdie kerne verskeie klein partikels soos fibrille en granules.

Die apikale sitoplasma van die selle toon vele lipieddruppels en teloliosome, wat ook lipieddruppels, osmofiliese materiaal en glukogeenryke vakuole bevat. Daar is ook vele klein elektrondigte vesikels (primêre lisosome). Opvallend is die voorkoms van oorvloedige onreëlmatige endoplasmiese retikula.

Verbindings tussen Sertoliselle in estrogeen behandelde weefsel is ontbrekend, terwyl gereelde intermediêre verbindings teenwoordig is tussen die apikale en laterale oppervlak van die aangrensende Sertoliselle, en tussen Sertoliselle en spermatogonia. Verskeie degeneratiewe Sertoliselle met donker sitoplasma en oneweredige kerne was ook waarneembaar.⁸

5.6.4. Sitologie van die Leydigselle

Volledig ontwikkelde Leydigselle het nie in een van die estrogeen behandelde modelle se weefselmonsters voor gekom nie. Inteendeel, die interstisiële weefsel vertoon klein versamelings van selle met donker granules en gelobde kerne. Onder die ligmikroskoop stem hierdie selle met fibroblaste ooreen. Elektronmikroskopie toon egter baie gladde endoplasmiese retikula in die vorm van anastomotiese tubules, vele lipieddruppels in teloliosome asook Reinke-kristalle wat as 'n skaarsheid beskou kan word. Die selle toon submembraneuse digte areas wat ook gedeeltelik oordek word met basale lamina. Met verlengde estrogeenbehandeling is die voorkoms van hierdie selle minder. Namate hierdie selle toeneem, het min of geen gladde endoplasmiese retikula, 'n paar teloliosome, lipieddruppels en bondels van 10nm filamente voorgekom. Klein areas was oordek met basale lamina. Na 10 jaar van estrogeentoediening is slegs klein selle met verlengings en yl verspreide sitoplasma om oneweredige kerne teenwoordig.⁸

5.7 OPSOMMEND

Testikulêre weefsel, wat na langtermyn gebruik van estrogeen met behulp van lig- en elektronmikroskopie geëvalueer is, het basies 'n uniforme voorkoms: Vernoude seminifereuse koorde is omring deur uitgebreide verdikte lamina propria. Hierdie seminifereuse koorde huisves uitsluitlik Sertoliselle en spermatogonia. Geen tipiese Leydigsele word waargeneem nie. Die oorblywende spermatogonia en die donkerder A-tipiese spermatogonia is feitlik geheel en al van die epiteel geïnhibeer.

Twee tipes eivormige kerne word in die Sertoliselle waargeneem. In vergelyking met onbehandelde weefsel is die kerne aangrensend tot die basale lamina geleë en die organelle en telosome is tot die apikale sitoplasma beperk. Die boonste en onderliggende differensiasie van volwasse selle is dus nie waargeneem nie. Sertoliselle het omvorm in onvolwasse selle wat ooreenstem met voorloperselle voor puberteit. Fibroblastagtige selle in die interstisiële weefsel met gelobde kerne, 'n goed ontwikkelde gladde endoplasmiese retikulum en die teenwoordigheid van lipieddruppels, kan aanvaar word dat gedifferensieerde Leydigsele teenwoordig is.

Dit is welbekend dat serum testosteroon- en gonadotropienvlakke verlaag is na die afloop van estrogeenbehandeling, wat die goeie korrelasie tussen die morfologiese veranderinge wat in die endokrinologiese status waargeneem is, verduidelik.

As gevolg van etiese beperkinge is min data met betrekking tot die effek van hormone op die morfologie van menslike testikulêre weefsel beskikbaar. Data van goed gedefinieerde spermatogenetiese veranderinge is slegs gevind en beskryf waar transseksuele mans se testikulêre weefsel, na langtermyn estrogeenbehandeling, ondersoek is.⁸

onwilligheid om vanuit 'n waterbakkie te drink. Addisionele waterbakkies is beskikbaar gestel om die probleem reg te stel.

- Muis 3 van Toets 1 het in teenstelling met al die ander muise (insluitend die placebo's) 'n massa-afname getoon met 'n massa meting van 16,4g op 8-weke-ouderdom. Sy semenanalise het egter goed vergelyk en geen kliniese verklaring kan vir die laer massa gegee word nie.

6.3 TESTISMASSA-EVALUASIE

	Toets 1	Kontrole 1	Toets 2	Kontrole 2
N	20	20	19	20
Mediaan	0.310	0.293	0.299	0.262
Reikwydste	0.184; 0.514	0.249; 0.365	0.148; 0.535	0.135; 0.745

Die gemiddelde testismassa is volgens die nie-parametriese Wilcoxin-toets vergelyk. 'n Berekende p-waarde = 0.219 > 0.05, impliseer dat die gemiddelde testismassa nie betekenisvol verskil het tussen die behandelingsgroepe nie.

6.4 SPERMKONSENTRASIE ($\times 10^6/\text{ml}$)

	Toets 1	Kontrole 1	Toets 2	Kontrole 2
N	20	20	19	20
Mediaan	110.5	105.5	90.0	113.5
Reikwydte	25.0; 295.0	50.0; 229.0	6.0; 166.0	28.0; 260.0

Die nie-parametriese Wilcoxin-toets is gebruik om die p-waarde te bereken. 'n Berekende p-waarde = 0.557 wat > 0.05 dui weer eens aan dat die gemiddelde spermkonsentrasies nie betekenisvol tussen die behandelingsgroepe verskil het nie.

Daar is wel waargeneem dat 1 umwaarde van 6.0 en mediaanwaarde van 90.0 laer is as dié van die ander behandelingsgroepe. Alhoewel nie statisties beduidend nie, wil dit wel voorkom asof Toets 2 se spermkonsentrasie negatief beïnvloed is.

Hierdie geringe negatiewe tendens toon wel dat estrogeniese toediening 'n inhiberende uitwerking op testisfunksie het. Hierdie studie toon hoë spermkonsentrasies van tot $295 \times 10^6/\text{ml}$ sowel as lae spermkonsentrasies vanaf $6.0 \times 10^6/\text{ml}$ aan. Normale spermatogenese het dus plaasgevind hoewel moontlik in Toets 2 'n inhiberende invloed ondervind is. Die waarneming van moontlike spermatogenetiese inhibering stem ooreen met die literatuur wat 'n algemene daling in spermkonsentrasies aan eksterne faktore soos estrogeen toeskryf.⁶

6.5 KWANTITATIEWE MOTILITEIT (% lewende spermatozoa)

	Toets 1	Kontrole 1	Toets 2	Kontrole 2
N	20	20	19	20
Mediaan	40.0	40.0	40.0	50.0
Reikwydte	10.0; 90.0	20.0; 50.0	0.0; 70.0	10.0; 80.0

Kwantitatiewe motiliteit tussen die behandelingsgroepe is ook volgens die nie-parametriese Wilcoxin-toets statisties vergelyk. Die berekende p-waarde = $0.263 > 0.05$. Die afleiding kan gemaak word dat die gemiddelde kwantitatiewe motiliteit nie betekenisvol tussen groepe verskil het nie.

6.6 KWALITATIEWE MOT

Kwalitatiewe motiliteit word geëvalueer op 'n skaal van 0 tot 3, waar 0 = geen motiliteit en 3 = progressiewe (vinnig, reguit vorentoe) beweging is.

Chi-Square (χ^2)-toets tabel vir kwalitatiewe motiliteit:

Kwalitatiewe motiliteit	Kontrole 1 (%)	Kontrole 2 (%)	Toets 1 (%)	Toets 2 (%)	Totaal
0	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (15.79)	3
1	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	1 (5.26)	2
2	3 (15.00)	2 (10.00)	6 (30.00)	4 (21.05)	15
2+	6 (30.00)	4 (20.00)	2 (10.00)	7 (36.84)	19
3	11 (55.0)	14 (70.00)	11 (55.0)	4 (21.05)	40
Totaal	20	20	20	19	79

Die Chi-Square (χ^2)-toets is gebruik om die moontlike verskil tussen motiliteit in behandelingsgroepe te bepaal. Die berekende p-waarde = 0.0359 < 0.05 dui op 'n betekenisvolle verskil in kwalitatiewe motiliteit tussen behandelingsgroepe. Dit wil voorkom asof die kwalitatiewe motiliteitspektrum van Toets 2 laer is as dié van Toets 1 en die kontrolegroepe. Kwalitatiewe motiliteit van 3 uit 19 (15,8%) muis in Toets 2 val in die 0-motiliteitskategorie. Die muis in die ander behandelingsgroepe resorteer in die 1-3-kwalitatiewe motiliteitskategorie. Toets 1 het ook slegs 5% muis wat in die 1-motiliteitskategorie voorkom, terwyl die laagste motiliteitsgrens van die kontrolegroepe 'n motiliteit van 2 is. Soortgelyk het die oorgrote meerderheid muis in Toets 1 'n motiliteit van 3 in vergelyking met Toets 2 waar die meerderheid tussen

1 en 3 voorkom. Die behanc moontlike negatiewe invloed op die kwalitatiewe motiliteit van Toets 2 gehad.

6.7 PATOLOGIESE EVALUERING

Elektronmikroskopiese evaluering van die semenmonsters toon normale spermkoppe en sterte. Die aksoneme toon die 9 + 9 + 2 tubulêre patroon en denien arms is teenwoordig. Genoemde bevindinge is by al die gevalle van Toets 1, Kontrole 1, Toets 2 asook by Kontrole 2 gevind. Sien aanhangsel 4.

Die testissnitte het distrofiese verkalkings in enkele van die testikulêre tubuli van slegs een testis van Toetsgroep 3, Toets 1 (muis 3) getoon. Die oorsaak van hierdie enkele testikulêre tubulêre verkalking is nie verklaarbaar nie. Toets 1 (muis 3) het, soos reeds genoem in teenstelling met al die ander muise 'n "wipplank"-effek ten opsigte van massatoename getoon en 'n eindmassa van slegs 16.4g gehad. Sy semenanalise het egter goed met die ander vergelyk. Ook hierdie lae massatoename is nie verklaarbaar nie.

'n Klein stukkie vet met vetnekrose is by Toets 2 (muis 2) waargeneem. Hierdie nekrose was gering en is deur die patoloë as onbeduidend beskou.

Testissnitte van Toets 1 (muis 5) toon 'n gelokaliseerde area van distrofiese verkalking, interstisiële fibrose en geringe abnormale spermatogenese. Hierdie patologiese waarnemings is gering en nie as betekenisvol beskou nie hoewel sy semenevaluasie verlaagde, maar in vergelyking met die groep 'n goed vergelykende analise getoon het.

Geen waarnemings van vernoude seminifereuse tubuli of verdikte lamina propria is gemaak nie. Geen tekens van fibrose buiten die bogenoemde geval is waargeneem nie en Leydigsel teenwoordigheid en -verspreiding was normaal.

Spermatogenetiese kiemselle 5% monsters as gering onderdruk waargeneem. Die Sertoliselvoorkoms, en -verspreiding was normaal. Twee tipes ovaalvormige kerne met 'n normale verhouding Sertolisel:kiemselle van $\pm 1:13$ het voorgekom. Die testikulêre weefsel het ook tipiese teenwoordigheid en verspreiding van organelle en volwasse sertoliselle getoon.

6.8 BESPREKING

'n Sterk saak kan dus uitgemaak word dat die oormatige blootstelling ("over exposure") aan estrogene of estrogeniese chemikalieë tydens die fetale periode veranderde ontwikkeling en funksionering van die testis en manlike reprodutiewe stelsel aanleiding kan gee. Oormatige estrogeniese blootstelling het oor die afgelope 30 tot 50 jaar in mense en diere toegeneem. Die blootstelling aan eksogene estrogene, soos DES, gedurende die fetale- en neonatale stadia kan tot verhoogde reprodutiewe abnormaliteite aanleiding gee. Die meganismes waar estrogeenblootstelling moontlik manlike reprodutiewe abnormaliteite kan induseer, is hipoteties bespreek en dien as basis vir verdere navorsing en bespreking. Afwykings in die ontwikkeling van die manlike reprodutiewe stelsel het gewoonlik nagevolge vir die geaffekteerde persoon en 'n groeiende getal mans val in hierdie kategorie. Hierdie getal geaffekteerde persone asook die reprodutiewe gevolge daarvan dien as aansporing vir verdere navorsing.

'n Nuwe ooreenkoms bestaan tussen zeranol en zearalenoen wat struktuur en chemiese werking betref. Zearalenoen is 'n miko-estogeen wat in graanprodukte vir menslike diëte voorkom. Zearalenoen se metabolisme in die mens en in die soogdier het dieselfde patroon: 'n saamgevormde en vry metaboliete vorm wat slegs van mekaar verskil as gevolg van die aan- of afwesigheid van 'n dubbelbinding by die koolstof 11- en koolstof 12-posisie. Zeranol, zearalenoen en hulle metaboliete het

dieselfde algemene effekte tot gevolg, behalwe dat dit in orale(mondelingse) dosering 100 tot 1000 keer minder aktief is as estradiol. RALs, zeranol en zearalenoen toon geen toksiese effekte buiten die wat aan hulle estrogeniese eienskappe toegeskryf kan word nie. Daar is ook geen wesentliche verskille tussen die effekte van zeranol, zearalenoen en hul metaboliete met proefdierstudies bevind nie. Zeranol se hormonale geen-effek-vlak by gekastreerde wyfie-ape is 0,05 mg/kg/dag. Langtermyn orale toksisiteitstudies op rotte het getoon dat die geen-effek-vlak van zearalenoen 0,1 mg/kg/dag is.³⁶

Die inhiberende effek van estrogeen op testosteroonproduksie is reeds ondubbelsinnig deur navorsers bewys. Studies is hoofsaaklik op testisweefsel van ouer mans met prostaatkarsinoom uitgevoer.^{72,73} Rodriquez-Rigou *et al.* (1977) het ook gerapporteer gegee met betrekking tot die langtermyn gebruik van estrogeen en die invloed daarvan op die sirkulerende hormone in jong transseksuele mans. Hierdie navorsers het gevind dat gonadotropien- en testosteroonkonsentrasies onderdruk is terwyl die konsentrasie van estradiol verhoog het. Hulle was van mening dat estrogeen die androgeenproduksie op twee meganismes kon wysig: i) 'n onmiddellike direkte effek op die Leydigselle, en ii) 'n indirekte effek deur middel van onderdrukking van gonadotropiene, wat oor 'n langer tydperk strek en 'n hoër dosering verg.⁷⁴

- Spermatogonia

Spermatogonia is die enigste selle wat estrogeenbehandeling oorleef. Hiervan bestaan die meerderheid uit die bleek A-tipe spermatogonia, terwyl die donker A-tipe spermatogonia byna afwesig is in die epiteel. Buiten die tipiese bleek chromatiënverkleuring toon hierdie spermatogonia meestal 'n konsentrasie van organelle rondom die kern. Spesifiek hierdie verskeidenheid van selle toon 'n



ooreenkoms met 'n fetus spermatogonia asook die "fetale spermatogonia" wat beskryf is in hipogonadotrofiese hipogonadisme.^{75,76} Die oorlewing van die bleek A-tipe spermatogonia en die geëlimineerde donker A-tipe spermatogonia stem ook ooreen met die beeld wat na bestraling en die behandeling met alkaliese middels verkry word.⁸ Die algemene gevolgtrekking is dus dat verskeie skadelike middels 'n eenvormige invloed op seminifereuse epiteel het, naamlik die germinale selpopulasie word verminder en verander na dieselfde seltype (bleek A-tipe spermatogonia). Studies waar muise en rotte bestraling ontvang het en waar 'n klein populasie van die spermatogonia die behandeling oorleef het, kan toegeskryf word aan spermatogonia se lang selsiklus.⁷⁷ Indien hierdie bevindinge by diere op die mens toepaslik gemaak word, is dit denkbaar dat die bleek A-tipe spermatogonia bestraling en chemoterapie oorleef as gevolg van hulle lae mitotiese metabolisme – hulle is in 'n stadium van relatiewe weerstandigheid ten tye van behandeling. Netso mag bleek A-tipe spermatogonia dit oorleef indien hulle ongunstige omstandighede beleef.⁸ Dieselfde redenasie word aanvaar dat die meerderheid van die spermatogoniale seltypes wat langtermyn estrogeenbehandeling oorleef het, dus uit stamselle bestaan het wat minder sensitief vir endokrinologiese versteurings en/of wanbelanse is.

- Sertoliselle

Estrogeenbehandeling het nie slegs 'n negatiewe effek op spermatogenetiese kiemselle nie maar beïnvloed ook die Sertoliselle deurdat hierdie selle na onvolwasse ongedifferensieerde selle omvorm word. Hierdie studie het egter nie 'n noemenswaardige negatiewe effek getoon nie. 'n Normale Sertoliselbeeld met gladde selwande wat baie ooreenstem met silinderepiteelselle, waar die selkerne langs die basale lamina geleë is, en organelle tot die apikale sitoplasma beperk is, is waargeneem. Volwasse Sertoliselle word gekarakteriseer deurdat die kerne in die

middel van die sitoplasma ge anelle slegs in die basale sitoplasma voorkom.⁸ Zeranól-behandeling het dus nie 'n negatiewe invloed op die Sertoliselvoorkoms en verspreiding gehad nie.

- Leydigsele

Soos in die geval van die Sertoliselle, is daar in hierdie studie geen noemenswaardige negatiewe invloed op die Leydigselvoorkoms en -verspreiding waargeneem nie. Slegs 'n enkele geval van fibrose is waargeneem.⁸ Die meerderheid van die Leydigselpopulasie het nie die omvorming na onvolwasse ongedifferensieerde selle getoon nie. Zeranóltodiening het dus ook nie 'n effek op die Leydigsele getoon nie.

6.9 GEVOLGTREKKING

Die konsentrasie van RALs wat die mens en dier inneem, as gevolg van RALs wat in graanprodukte voorkom, word nie noemenswaardig by mense verhoog indien hulle vleisprodukte gebruik waarvan die slagvee wel zeranól as implantaat ontvang het nie. Hieruit kan die afleiding gemaak word dat die invloed wat zeranól, wat as implantaat op menslike blootstelling swak estrogeniese aktiwiteit veroorsaak, nie wesentliche nagevolge veroorsaak nie. Lae estrogeniese aktiwiteit van beide graan- en vleisprodukte het dus nie die verwagte nadelige uitwerking op menslike gesondheid en fertiliteit nie.

STUDIE-OORSIG

7.1 INLEIDING

Die doel van hierdie hoofstuk is om:

- 'n opsomming van die literatuuroorsig te gee,
- 'n opsomming van die belangrikste bevindings van hierdie studie weer te gee,
- algemene aanbevelings te maak, en
- aanbevelings vir toekomstige navorsing te doen.

7.2 OPSOMMING VAN DIE KERNGEDAGTES EN HOOFBEVINDINGS VAN DIE LITERATUURSTUDIE

"Humans now live in an environment that can be viewed as a virtual sea of estrogens" (Field, 1990).¹⁴

Estrogeen of estrogeniese stowwe kom in die omgewing voor as eksogene (estrogeenanaloë) stowwe, wat veral in landbou gebruik word, en as fito-estrogene, wat natuurlik in plante en fungi voorkom en aanleiding gee tot estrogeen in produkte soos melk en ander suiwelprodukte. Die ontwikkeling van medikasie het ook bygedra dat chemikalieë wat estrogeniese eienskappe openbaar, gebruik word in die vervaardiging van medikasie soos die voorbehoedpil.

Dierestudies word gedoen om die invloed van middels soos zeranol en zearalenoen wat in hierdie studie gebruik is en wat estrogeniese eienskappe openbaar, te bepaal. Studies het getoon dat zeranol wel teratogenies, genotoksies en karsinogenies is,

asook manlike fertiliteit benadeel deur die moeder estrogeniese middels inneem. Sodoende word die menslike nageslag benadeel.

Die moontlike belang van oorblyfsels van sulke estrogeniese middels, asook die veiligheid en risikobepaling vir menslike gebruik, is getoets. Die uitslae van hierdie veiligheidstoetse het in die geen-meetbare-effek-vlak geval. Die gebruik van zeranol en zearalenoon as hormoonstimulante in die voedselbedryf is as veilig vir menslike gebruik bevind.^{37,38}

7.3 OPSOMMING VAN DIE HOOFBEVINDINGS VAN HIERDIE STUDIE

Die resultate en uitkoms van hierdie studie mag deur navorsers verskillend geïnterpreteer word. Die doel van hierdie studie was om die invloed van 'n estrogenaanaloog (zeranol) op die testikulêre funksie van muismodelle, te evalueer. Dit het aanleiding gegee tot die volgende waarnemings:

- Muismassabepalings: Onvoorsiene eksterne faktore soos die onwilligheid en/of onvermoë van die jong muis om uit die voorsiende waterbotteljies te kon drink, het op 'n spesifieke tydstip 'n betekenisvolle verskil getoon.
- Die gemiddelde testismassa het nie tussen die groepe betekenisvol verskil nie.
- 'n Geringe negatiewe neiging is by die spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$) van Toets 2 in vergelyking met Toets 1 en die kontroles waargeneem.
- Kwantitatiewe motiliteit (% lewende spermatozoa) het egter nie betekenisvol tussen die groepe verskil nie.
- Kwalitatiewe motiliteit (progressiewe beweging op 'n skaal van 0 tot 3) het wel 'n statistiesbetekenisvolle verskil tussen die behandelingsgroepe getoon. Toets 2 se kwalitatiewe motiliteitsspektrum was laer as Toets 1 sowel as die

kontrolegroepe. Toets 1 se motiliteitspektrum het tussen 1 tot 3 sorteer waar Toets 2 se motiliteitspektrum verlaag is en 15.8% met 'n 0-motiliteit ingesluit het. Toets 1 het slegs 5% gevalle gehad wat in die 1-motiliteitskategorie voorkom, terwyl die laagste motiliteitsgrens van die kontrolegroepe 'n motiliteit van 2 was.

- Patologies het enkele testissnitte slegs geringe tekens van distrofiese verkalking, vetnekrose en interstisiële fibrose getoon. Die patoloë het hierdie waarnemings egter nie as betekenisvol beskou nie.
- Die elektronmikroskopiese evaluering het normale spermatozoa oor die hele monsterspektrum getoon.

7.4 ALGEMENE AANBEVELINGS EN TEKORTKOMINGE

- Drie behandelingsgroepe word aanbeveel en as voldoende beskou:

Toets 1 – Eenmalige toetsstoftoediening

Toets 2 – 48-uurlikse toetsstoftoediening

Placebogroep – Dien as kontrolegroep

- Die verdeling van beskikbare muise in slegs drie groepe sal dus bydra dat elke groep uit 'n vergrote aantal muise bestaan wat die statistiese verwerking kan vergemaklik.
- Die bekombaarheid van die zeranol-spuitstofpoeier was 'n probleem. Slegs 'n sekere aantal gram zeranol mag per bestelling ingevoer word. Verskillende besendings is dus ontvang. Die beperkte aantal spuitstof per bestelling het dus veroorsaak dat die hele muisreeks in Muisgroepe 1, 2, 3 en 4 verdeel moes word.

- Die groep verdeling is ook en dit nie prakties uitvoerbaar was om 60 muise as 'n geheel te weeg en te behandel nie.
- Aangesien die zeranol verskaffers nie 'n verteenwoordiger vir die Vrystaat spesifiek toegeken het nie, het dit ook bygedra dat alle bestellings en reëlins met betrekking tot die spuitstof telefonies gedoen moes word. Telefoniese bestellings is as 'n nadeel beskou deurdat persoonlike kontak kon bydra tot belangstelling van die verteenwoordiger se kant en dus dienslewering kon bespoedig het.
- Tydsbeperking is met betrekking tot die elektronmikroskopiese evaluasies ook negatief ervaar. Elektronmikroskopiese evaluering verg tydsame voorbereiding en evaluering van semenmonsters. Evaluasies is ook as addisionele werksopdrag by die roetine werkslading gedoen.

7.5 AANBEVELINGS VIR TOEKOMSTIGE NAVORSING

- Verdeling van proefdiermodelle in slegs drie behandelingsgroepe soos voorgestel onder 7.4.
- 'n Verhoogde aantal muise per behandelingsgroep word aanbeveel om sodoende onverwagte mortaliteit te kan akkommodeer.
- Indien prakties uitvoerbaar, word aanbeveel dat die navorser 'n nouer betrokkenheid met die versorging van die proefdiere het sodat praktiese probleme soos die waterbottelprobleem voorkom kan word.
- 'n Skakelpersoon of verteenwoordiger van die firma wat die behandelingstowwe voorsien word aanbeveel om bestelling en aflewering van middels te bespoedig.

- Tydsduur van die studie sa  et word om by die verhoogde aantal proefdiere wat behandeling, monsterversameling en monster evaluasie ondergaan, aan te pas.

7.6 GEVOLGTREKKING

Zeranol: 'n Estrogeenanaloo se invloed op die testikulêre funksie van muise het nie statisties betekenisvolle verskil teenoor die kontrolegroepe getoon nie. In hierdie studie is daar slegs enkele waarnemings van inhibering van die semenkwaliteit asook enkele gevalle van geringe patologie van die testisweefsel. Zeranol het dus nie 'n statisties betekenisvolle negatiewe effek op die testisfunksie van die muismodelle nie. Hiermee word die H1-hipotese verwerp en die alternatiewe hipotese aanvaar. Die gebrek aan statistiese betekenis impliseer nie dat die bevindings geen kliniese belang het nie. Die onderdrukking van spermatogenetiese kiemselle met 2.5%, tesame met die waarnemings van verlaagde spermkonsentrasies en die kwalitatiewe motiliteit van die semenmonsters is wel klinies van belang. Indien dieselfde onderdrukkende of inhiberende effek by mensstudies gevind word, kan dit moontlik klinies 'n beduidende effek op manlike fertiliteit hê, veral by mans met oligospermie (lae spermkonsentrasies).

Die noodsaaklikheid om middels soos zeranol deurlopend vir menslike veiligheid te toets, word dus aanbeveel en beklemtoon. Die invloed van 'n enkele middel of faktor mag moontlik in individuele toetse as "veilig" beskou word, maar manlike fertiliteit word egter moontlik deur 'n kombinasie van kumulatiewe faktore wat in die omgewing voorkom of ingeneem word, beïnvloed.

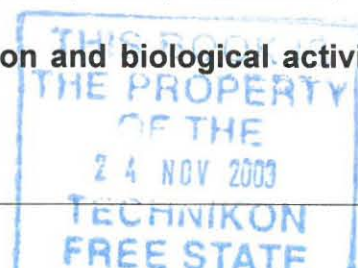
1. Metzler, M. **Metabolism of some anabolic agents: Toxicological and analytical aspects.** Journal of Chromatography, 1989, (489): 11-12.
2. Arai, Y., Mori, T., Suzuki, Y., Bern, HA. **Long-term Effect of Perinatal Exposure to Sex Steroids and Diethylstilbestrol on the Reproductive System of the Mammals.** Int Rev Cytol., 1983, (84): 235-268.
3. Ueno, Y. **The toxicology of mycotoxins.** CRC Critical Reviews in Toxicology, 1985, (14): 445-448.
4. Lindsay, D.G. **Zeranol – A “Nature-identical” oestrogen?** Fd Chem Toxic. 1985: 23 (8): 767-774.
5. Pérez-Martínez, C., García-Iglesias, M.J., Ferreras-Estrada, M.C., Bravo-Moral, A.M., Espinosa-Alvarez, J., Escudero-Diez, A. **Effects of In-utero Exposure to Zeranol or Diethylstilboestrol on Morphological Development of the Fetal Testis in Mice.,** J Comp Path, 1996, (114): 407-418.
6. Sharpe, R.M.; Skakkebaek, N.E. **Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?** The Lancet, 1993, (341): 1392-1395.
7. Staigmiller, R.B.; Brownson, R.M., Kaartchner, R.J.; Williams, J.H. **Sexual development in beef bulls following zeranol implants.** J. Animal Science, 1985, (2):60.

8. 8.Schulze, C., **Response of the human testis to long-term estrogen treatment: Morphology of Sertoli cells, Leydig cells and spermatogonial stem cells.** Cell Tissue Res. 1988, (251): 31-34.
9. **World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction;** Fourth Edition; 1999: 1-34.
10. Osterlind, A., **Diverging trends in incidence and mortality of testicular cancer in Denmark, 1943-1982.** Br. J. Cancer, 1986; (53): 501-505.
11. Giwercman, A.; Skakkebaek, N.E. **The human testis – an organ at risk?** International Journal of Andrology, 1992; (15): 373-375.
12. Jackson M.B., John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Research Group. **The epidemiology of cryptorchidism.** Hormonal Research, 1988, (30): 153-156.
13. Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E. **Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.** BMJ, 1992, (305): 609-613.
14. Field, B., Selub, M.; Hughes, C.L.. **Reproductive effects of environment agents.** Semin Reproductive Endocrinology, 1990, (8): 44-54.
15. Kaldas, R.S., Hughes, C.L.. **Reproductive and general metabolic effects of phyto estrogens in mammals.** Reproductive Toxicology, 1989, (3): 81-89.
16. Verdeal, K., Ryan, D.S.. **Naturally-occurring oestrogens in plant foodstuffs – a review.** Journal of Food Protect, 1979, (7): 577-583.
17. Adlercreutz, H.. **Diet, breast cancer and sex hormone metabolism.** Annual New York Academy of Science. 1990, (595): 281-290.

18. Hamon, M., Fleet, I.R. **Comparison of oestrone sulphate concentrations in mammary secretions during lactogenesis and lactation in dairy ruminants.** Journal of Dairy Res., 1990, (57): 419-422.
19. Forest, M.G.. **Development of the male reproductive tract.** In: Aspects of male infertility. Balitmore: Williams & Wilkins, 1982: 1-60.
20. Hutson, J.M., Williams, M.P.L., Fallat, M.E., Attah, A.. **Testicular descent : new insights into its hormonal control.** In : Milligan SR, ed. Oxford reviews of reproductive biology. Oxford University Press, 1990: 1-56.
21. De Graaff, W.E., Oosterhuis, J.W., de Jong, B., *et al.* **Ploidy of testicular carconoma *in situ*.** Laboratory Investigations 1992; (66): 166-168.
22. Walker, A.H., Bernstein, L., Warren, D.W., Warner, N.E., Henderson, B.E.. **The effect of in vitro ethinyloestradiol exposure on the risk of cryptorichid testis and testicular teratoma in mice.** *Br J Cancer* 1990 (62): 599-603.
23. Yasuda, Y., Kihagji, T., Tanimura, T., Nishimura, H.. **Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estratiol in mice.** *Teratology* 1985, (32): 210-229.
24. Sharpe, R.M.. **Falling spermcounts in men – is there an endocrine cause?** *Journal of Endocrinology*, 1993, (137): 357-360.
25. Sager, D., Girar, D., Nelson, D.. **Early postratal exposure to PCBs: Sperm function in rats.** *Environ Toxicology Chemical*, 1991, (10): 737-746.



26. Cortes, D., Muller, J., .E.. **Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods.** International Journal of Andrology, 1987, (10): 589-596.
27. Russel, L.D.; Peterson, R.N.. **Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals.** Journal of Reproduction and Fertility, 1984, (70): 635-641.
28. Orth, J.M., Gunsalus, G.M.; Lamperti, A.A. **Evidence from Sertoli; cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depend on number of Sertoli cells produced during perinatal development.** Journal of Endocrinology, 1988, (122): 787-794.
29. Baldwin, R.S., Williams, R.D., Terry, M.K.. **Zeranol: A review of the metabolism, toxicology and analytical methods for the detection of tissue residues.** Regul. Toxic. Pharmac. 1983, (3): 9.
30. Becci, P J., Johnson, W.D., Hess, F.G., Gallo, M.A., Parent, R.A., Taylor, J.M.. **Combined two-generation reproduction – teratogenesis study of zearalenone in the rat.** Journal for applied Toxicology, 1982a, (.2): 201.
31. Davis, G.J., Mclachlan, J.A., Lucier, G.W.. **Fetotoxicity and teratogenicity of zeranol in mice.** Toxicology in applied Pharmacology, 1977 (41): 138.
32. Ruddick, J.A., Scott, P.M., Harwin, J.. **Teratological evaluation of zearalenone administered orally to the rat.** Bulletin for Environmental Contaminated Toxicology, 1976 (15): 678.
33. Hidy, P.H., Baldwin, R.S., Gresham, R.L., Keith, C.L., McMullen, J.R.. **Zearalenone and some derivatives: production and biological activities.** Advanced applied Microbiology. 1977, (22): 59.



34. JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Twenty-seventh Report: **Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. World Health Organization, 1983, (696): 33.
35. Janski, A.M.. **Development of a sensitive method for extraction and assay of zeranol residues in animal tissues and the use of the method in a multiple implant study in cattle**. In: *Anabolics in Animal Production*, 1983,: 443.
36. Griffin, T., Parekh, C.; Singh, A., Coulston, F.. **No hormonal effect level of zeranol in the cynomolgus monkey**. European Toxicology Forum, Geneva, October 18-22, 1983: 435.
37. **Hormone, stimulant in beesvleis doen mens geen kwaad**. Landbouweekblad, 9 Junie2000: 56.
38. **Groeistimulant is veilig en doeltreffend**. Landbouweekblad, 9 Junie 2000:58.
39. Foster, H.L.; Small, J.D.; Fox, J.G.. **The Mouse in Biomedical Research. Volume III Normative Biology, Immunology, and Husbandry**. Academic Press Limited, California, 1983: 166-224.
40. Pointis, G.; Mahoudeau, J.A.. **Responsiveness of foetal mouse testis to gonodotropins at various times during sexual differentiation**. *Journal of Endocrinol.*, 1977 (74): 945-952.
41. Barkley, M.S.. **Serum prolactin in the male mouse from birth to maturity**. *Journal of Endocrinol.*, 1979, (83): 31-33.

42. Barkley, M.S., Goldmar **Comparative study of serum testosterone, sex accessory organ growth, and the development of inter male aggression in the mouse.** Hormonal Behav., 1977 (8): 208-218.
43. Bartke, A., Goldman, B.D., Bex, F., Dalterio, S.. **Effects of prolactin (PRL) on pituitary and testicular function in mice with hereditary PRL deficiency.** Endocrinology, 1977, (101): 1766-1766.
44. Jackson, I.M.D.. **Phylogenetic distribution and function of the hypophysiotropic hormones of the hypothalamus.** A.M. Zoology., 1978 (18): 385-399.
45. Bloch, E., Lew, W., Klein, M.. **Studies on the inhibition of fetal androgen formation : Testosterone synthesis by fetal and newborn mouse testes in vitro.** Endocrinology, 1971, (88): 41-46.
46. Hall, P.F.. **Testicular hormones : Synthesis and Control.** Endocrinology, 1979, (3): 1511-1519.
47. Williams-Ashman, H.G.. **Biochemical features of androgen physiology.** Journal of Endocrinology, 1979, (3): 1527-1533.
48. Wilson, J.D., Lasnitzki, I.. **Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat.** Journal of Endocrinology, 1971, (89): 659-668.
49. Alison, M.R., Wright, N.A.. **Testosterone 5 α -reductase activity as related to proliferative status in mouse accessory sex glands.** Journal of Endocrinology, 1979 (81): 83-92.

50. Angeletti, R.A., Angele **Testosterone induction of estero-proteolytic activiey in the mouse submaxillary gland.** Biochim. Biophys. Acta 1967 (139): 372-381.
51. Bhoola, K.D., Dorey, G., Jones, C.W.. **The influence of androgens on enzymes and on cellular structure of the mouse submaxillary gland.** Journal of Physiology, London. 1973 (235): 503-522.
52. Oliver, W.F., Gross, F.. **Effects of testosterone and duct ligation on submaxillary renin-like principle.** A.M.Journal of Physiology., 1967, (213): 341-346.
53. Ishii, D.N., Shooter, E.M.. **Regulation of nerve growth factor synthesis in mouse submaxillary glands by testosterone.** Journal of Neurochemistry. 1975 (25): 843-851.
54. Bygny, E.L., Orth, D.N., Cohen, S., Doyne, E.S.. **Epidermal growth factor : Effects of androgens and andrenergic agents.** Endocrinology 1974 (95): 776-782.
55. Chrétien, M.. **Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ : The submaxillary gland of the mouse.** Int. Cytol., 1977, (50): 333-397.
56. Bardin, C.W., Bullock, L.P., Sherins, R.J., Mowszowioz, I., Blackburn, W.R.. **Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudo heraphroditism : Study of testicular feminization.** Recent Progress on Hormonal Residue, 1973, (29): 65-109.
57. Olsen, K.L.. **Induction of male mating behavior in androgen-insensitive (Tfm) and normal (King Holtzman) male rats : Effect of testosterone**



Behavior., 1970, (13): 66-84.

58. MacLusky, N.J., Naftolin, F.. **Sexual differentiation of the nervous system.** Sciena, 1981, (211): 1294-1303.
59. Badr, F.M., Bartke, A., Dalterio, S., Bulger, W.. **Suppression of testosterone production by ethyl alcohol. Possible mode of action.** Steroids, 1977, (30): 647-655.
60. Dalterio, S.; Bartke, A.; Roberson, C.; Watson, D.; and Burstein, S.. **Direct and pituitary-mediated effects of delta 9-THC and cannabinalol on the testis.** Pharmacol., Biochem. Behav. 1978 (8): 673-678.
61. Davies, A.G., Lawrence, N.R.. **Timing and sites of testicular effects of FSH *in vivo*.** In "Structure and Function of the Gonadotropins" (K.W. McKerns, ed.), Plenum, New York 1978: 473-495.
62. Steinberger, E., Fisher, M., Smith, K.D.. **The Human Testes.** E. Roseberg & C.A. Paulsen (Eds.) Plenum Press, New York-London, 1970: 439.
63. McElreavey, K.. **The Genetic Basis of Male Infertility.** Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York Germany, 2000: 1-17; 53-94; 187-278.
64. O'Lamhna, M., Roche, J.F.. **Effect of repeated implantation with anabolic agents on growth rate, carcass weight, testicular size and behavior of bulls.** The Veterinary Record December 3, 1983.
65. Howrwtitz, C., Rozen, P., Gilat, T.. **Should we worry about animal growth promoters?** Forum, 1983, 5 (1): 51-54.

66. Ueno, Y. Tashiro, F.. **major hepatic metabolite in rats of zearelenone, an estrogenic mycotoxin of *Fusarium* Species.** Journal of Biochemistry. 1981 (89): 563-571.
67. Bancrofts, J.D.; Stevens, A.. **Theory and practice of histological techniques.** Third Edition, 1990: 1-686.
68. Hayat, M.A.. **Principles and Techniques of Electron microscopy.** Biological applications, Third Edition, 1970, (1): 5-319.
69. Glauert, A.M.. **Practical Methods in Electron Microscopy.** 1974,(1): 3-178.
70. Spurr, A.R.. **A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.** Journal Ultrastr. Research, 1969, (26): 31-43.
71. Cooper, G.M.S.. **'n Ultrastrukturele morfometriese studie van normale en abnormale menslike bloedplaatjies.** M. Med.Sc. 1987: 32-41.
72. Slaunwhite, W R., Sandberg, A.A., Jackson, J.E., Staubitz, W.J.. **Effects of estrogen and HCG on androgen synthesis by human testes.** Journal of Clinical Endocrinological Metabolism. 1962 (22): 968-973.
73. Yanaihara, T, Troen, P.. **Studies of the human testis. III. Effects of estrogen on testosterone formation in human testis *in vitro*.** Journal of Clinical Endocrinological Metabolism. 1972 (34): 968-973.
74. Rodriguez-Rigau, L.J., Tcholakian, R.K., Smith, K.D., Steinberger, E.. ***In Vitro* steroid metabolic studies in human testes. Effects of estrogen on progesterone metabolism.** Steroid, 1977, (29): 771-787.
75. Fukuda, T., Hedinger, C., Groscurth, P.. **Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis.** Cell Tissue Research, 1975 (161): 55-70.



76. Kretser de, D.M.. **The** **of the immature human testis in hypogonadotropic hypogonadism.** Pathological Anatomy, 1968 (1): 283-296.
77. Huckins, C.. **Behavior of stem cell spermatogonia in the adult rat irradiated testis.** Biological Reproduction, 1978 (19): 747-760.

AANHANGSEL 1

MASSA LESING: Groep 1 (Lesings in gram)

Zeranol Dosis: 150 µg/kg/dag

Datum	11/5	13/5	15/5	17/5	19/5	21/5	23/5	25/5	27/5	29/5	31/5	2/6	4/6	6/6	8/6	10/6	12/6	14/6
Muis																		
Toets 1																		
1	9.61	11.12	13.12	13.88	16.70	19.54	21.09	22.23	22.91	23.96	24.80	23.30	26.77	27.11	27.43	28.26	29.33	29.34
2	9.69	11.33	15.13	17.17	20.10	21.30	21.71	23.13	23.03	23.71	24.11	24.60	26.07	26.12	26.69	27.41	28.28	28.14
3	10.00	11.34	15.00	18.08	20.41	22.22	23.56	24.69	24.46	21.95	25.20	26.70	27.42	27.88	27.53	29.21	29.60	29.82
4	10.19	10.77	13.30	15.36	17.10	18.61	19.40	20.18	21.13	22.79	21.76	22.49	23.74	23.65	24.15	24.91	25.37	25.52
5	9.45	11.36	14.24	15.80	17.20	19.52	20.97	21.92	22.88	24.78	24.83	25.99	27.11	26.96	27.21	27.76	27.83	28.85
Kontr 1																		
1	10.21	11.43	13.81	14.42	15.92	18.52	20.54	22.66	22.95	24.54	25.13	25.89	26.88	27.82	28.57	29.42	30.37	30.96
2	8.74	12.91	14.62	15.89	16.71	20.39	21.78	22.77	23.12	23.81	25.18	25.61	26.20	26.86	27.68	27.79	29.28	29.68
3	9.12	10.98	13.30	14.93	15.40	17.78	19.60	21.23	22.40	25.46	22.97	23.07	24.40	24.60	25.32	26.00	26.55	27.27
4	9.39	11.41	14.51	15.35	16.90	18.17	19.74	21.46	21.95	21.13	24.46	25.25	27.50	28.08	28.80	29.44	30.66	31.21
5	9.74	13.00	14.81	15.67	17.43	20.40	21.96	23.18	23.56	24.16	25.80	26.65	26.21	26.63	27.30	28.14	29.20	29.88
Toets 2																		
1	8.74	8.63	10.64	15.32	18.00	20.00	20.78	22.74	23.51	24.80	25.40	25.89	27.40	27.70	28.18	29.17	29.99	29.89
2	9.35	6.76	8.71	12.48	14.40	16.96	18.79	21.28	23.50	24.40	24.74	25.25	26.34	27.29	27.88	28.48	29.27	29.57
3	9.62	6.71	8.72	12.19	14.21	16.98	19.22	21.57	23.67	24.84	25.20	25.90	26.92	27.62	28.94	29.20	29.84	30.88
4	10.72	7.01	9.30	12.99	15.46	18.12	20.33	23.30	25.02	25.59	26.10	26.68	27.49	28.03	28.43	29.01	30.66	31.13
5	9.15	7.28	9.25	13.26	15.63	17.97	20.03	22.50	24.39	24.95	26.00	27.25	28.64	28.90	29.45	29.95	29.77	30.32
Kontr. 2																		
1	9.31	8.42	10.80	13.36	15.51	16.61	18.63	19.87	20.72	21.15	21.35	22.23	23.08	23.36	24.21	26.01	26.19	26.60
2	9.15	8.35	9.21	12.46	14.62	16.40	18.20	20.18	22.05	22.93	23.41	23.91	24.69	25.21	25.23	26.44	26.59	27.07
3	9.54	9.00	11.31	13.93	16.60	18.23	19.54	21.51	22.84	23.72	24.49	25.04	25.58	26.18	26.69	28.08	28.50	28.36
4	8.99	8.62	11.00	14.40	16.61	18.33	19.97	21.58	22.39	22.74	23.50	24.18	25.46	26.07	26.64	27.50	28.34	28.77
5	9.79	8.88	9.96	13.36	15.47	16.65	18.11	20.02	21.48	22.23	22.80	23.85	25.11	26.04	26.32	27.30	27.66	28.00

MASSA LESING: Groep 2 (Lesings in gram)

Aangepaste Zeranol Dosis: 2mg/kg/dag

Datum	4/10	6/10	8/10	10/10	12/10	14/10	16/10	18/10	20/10	22/10	24/10	26/10	28/10	30/10	1/11	3/11	5/11	7/11
Muis																		
Toets 1																		
1	11.58	11.42	10.16	12.26	15.75	18.82	20.46	22.35	24.48	25.41	26.45	27.03	27.67	28.03	28.00	28.53	29.19	28.75
2	11.63	11.86	10.71	13.81	17.12	19.45	20.30	22.09	24.20	25.72	26.70	27.70	28.22	28.57	27.01	29.17	30.72	30.88
3	10.52	9.86	9.00	10.51	14.51	17.18	17.60	19.44	21.51	22.50	23.82	25.21	26.11	26.46	26.63	26.87	27.54	26.24
4	11.65	11.45	10.39	13.40	15.93	16.69	17.64	19.49	20.95	20.90	22.01	23.33	23.84	24.69	24.50	24.63	25.94	25.70
5	10.72	10.71	9.94	13.34	15.36	17.54	18.44	20.99	22.56	22.83	24.30	25.70	26.01	26.03	26.20	26.31	26.90	27.19
Kontr 1																		
1	11.62	13.36	17.38	18.45	20.04	21.21	23.30	23.03	23.84	24.63	26.18	27.15	27.56	27.81	27.99	28.30	28.50	29.60
2	12.85	13.70	17.34	19.27	21.12	22.34	23.76	23.57	24.29	25.13	25.30	26.63	27.07	27.36	27.88	28.66	28.29	28.79
3	10.42	11.73	15.67	18.11	19.84	22.18	23.78	24.39	25.88	26.96	27.83	28.43	29.09	29.44	29.86	30.23	30.60	30.86
4	11.45	12.43	16.62	18.87	20.98	22.56	24.13	24.53	25.77	26.75	27.79	28.50	29.19	29.65	29.91	30.20	30.62	32.00
5	12.72	13.85	17.63	18.90	20.51	21.66	22.33	23.69	24.18	25.29	25.58	26.01	26.34	27.07	27.00	27.06	27.92	28.41
Toets 2																		
1	11.82	13.01	16.58	17.84	19.93	20.55	21.63	22.08	22.56	23.98	25.23	25.63	25.44	27.65	27.50	27.28	28.34	28.32
2	10.85	12.05	15.80	17.47	19.65	21.59	22.52	22.61	24.06	25.04	25.98	27.07	26.99	27.65	27.59	28.43	28.71	29.44
3	12.42	13.85	17.84	18.87	20.51	20.79	21.55	21.89	22.20	23.40	24.31	24.59	25.13	26.65	26.84	26.95	27.03	27.51
4	11.27	12.51	16.58	17.98	20.17	22.09	23.35	23.47	25.08	25.84	26.47	26.98	27.56	27.59	28.61	28.89	28.53	28.58
5	11.81	12.97	17.25	18.64	20.03	21.09	21.63	22.60	23.20	24.28	24.86	24.81	25.84	27.12	27.10	27.07	27.92	28.84
Kontr. 2																		
1	12.16	12.23	17.73	18.36	19.42	20.08	21.50	22.12	23.79	24.51	25.42	26.60	25.41	26.21	26.50	26.76	27.81	26.63
2	12.36	12.81	16.26	17.54	19.27	19.60	21.06	21.53	24.26	24.95	26.80	27.51	27.15	27.24	27.30	27.34	28.68	28.30
3	12.01	12.95	17.13	17.37	19.25	19.75	20.90	22.05	22090	24.04	25.48	26.16	25.37	26.83	27.20	28.28	28.84	28.53
4	12.39	12.66	17.53	18.37	20.45	20.79	21.87	22.24	23.53	24.08	25.84	26.58	26.59	27.36	27.29	27.26	29.30	28.32
5	10.69	12.01	14.84	16.45	17.84	17.12	19.06	19.42	21.73	22.68	24.29	24.95	23.15	24.35	24.90	25.42	26.13	25.35

MASSA LESING: Groep 3 (Lesings in gram)

Aanangepaste Zeranol Dosis: 2mg/kg/dag

Datum	9/5	11/5	13/5	15/5	17/5	19/5	21/5	23/5	25/5	27/5	29/5	1/6	3/6	5/6	7/6	9/6	11/6	13/6
Muis																		
Toets 1																		
1	10.7	12.3	15.1	14.5	14.0	13.6	17.4	19.0	21.2	21.9	22.6	23.7	24.4	23.9	24.0	24.7	23.9	24.8
2	10.4	13.4	13.8	13.6	16.5	13.7	17.8	19.4	19.5	21.1	21.8	22.5	21.8	23.0	23.2	24.4	23.7	25.4
3	10.4	14.1	13.1	12.2	11.8	11.6	13.2	14.2	15.5	16.7	17.0	17.4	16.1	16.8	17.3	16.3	16.4	16.4
4	12.1	13.7	15.5	15.9	16.5	17.5	19.1	19.9	22.6	22.5	23.3	23.8	23.9	24.5	24.6	25.0	25.2	25.4
5	11.3	14.0	14.0	13.9	13.1	14.3	16.5	18.3	21.1	21.1	21.6	22.8	21.7	22.5	23.3	23.5	22.9	23.4
Kontr 1																		
1	10.97	9.7	15.2	15.9	16.5	17.7	20.2	20.0	20.4	21.2	21.2	22.0	21.4	22.6	24.0	23.9	23.8	24.3
2	11.63	9.0	15.4	15.9	16.5	17.0	18.4	18.2	18.6	20.2	19.2	19.7	19.3	21.1	21.9	22.9	23.3	23.7
3	12.52	8.8	17.1	17.0	17.1	19.0	19.4	20.4	20.7	21.7	22.2	22.9	22.6	23.6	24.8	25.0	25.5	25.9
4	11.94	10.4	16.9	16.8	17.7	19.3	21.1	21.6	21.1	23.0	23.1	23.7	24.3	24.6	25.9	26.0	26.8	26.6
5	12.30	9.0	16.6	16.9	17.0	17.7	19.0	19.5	19.4	21.1	20.4	21.4	21.6	21.5	22.4	23.0	23.6	23.0
Toets 2																		
1	9.9	11.6	12.6	13.9	15.7	14.9	16.0	16.9	18.1	17.7	17.8	18.0	18.9	19.5	19.8	19.3	20.4	21.0
2	10.5	12.2	13.2	13.0	13.5	16.6	19.2	20.2	21.7	21.8	22.1	23.4	23.9	24.4	25.5	25.9	26.9	27.3
3	9.5	11.6	12.8	14.1	15.4	15.6	17.8	19.0	19.6	19.9	20.0	20.5	21.0	21.7	21.4	21.5	22.4	22.8
4	10.0	11.7	13.7	14.3	15.0	16.6	17.9	19.3	20.9	21.1	21.6	22.4	23.0	23.2	24.3	24.2	25.2	25.6
5	10.1	11.8	14.1	14.6	14.4	17.1	18.1	18.3	19.4	19.8	20.4	21.4	21.5	Dood	Dood	Dood	Dood	Dood
Kontr. 2																		
1	11.05	13.8	15.5	14.5	16.2	18.6	19.7	20.2	21.4	22.8	23.2	24.5	24.7	26.0	27.2	28.0	28.6	28.7
2	9.14	10.4	12.5	14.9	14.4	14.5	17.4	19.1	20.5	22.3	23.3	24.3	20.2	26.2	27.1	27.3	27.6	28.1
3	9.25	11.1	13.7	14.0	15.3	16.2	18.8	19.4	20.9	23.1	23.9	25.0	22.4	25.7	26.6	28.2	28.8	28.9
4	11.10	12.0	13.8	15.6	15.6	15.6	17.2	17.5	18.7	20.2	20.2	21.1	24.0	21.1	22.4	22.9	23.8	24.3
5	10.55	10.8	12.5	15.4	15.2	15.3	18.3	18.4	19.5	21.1	23.0	23.0	24.8	23.1	26.9	25.9	26.1	25.7

MASSA LESING: GROEP 4 (Lesings in gram)

Aangepaste Zeranol Dosis: 2mg/kg/dag

Datum	9/5	11/5	13/5	15/5	17/5	19/5	21/5	23/5	25/5	27/5	29/5	1/6	3/6	5/6	7/6	9/6	11/6	13/6
Muis																		
Toets 1																		
1	12.8	11.6	12.9	18.0	18.6	18.8	20.4	20.7	21.6	23.1	23.2	23.3	23.2	24.4	24.8	25.0	24.9	25.0
2	10.5	11.2	13.9	14.9	15.8	17.0	18.6	19.2	21.0	21.9	22.2	22.5	22.6	23.8	24.3	24.9	25.1	25.0
3	12.3	12.1	14.4	16.5	17.6	18.2	19.7	20.0	20.4	21.4	21.9	21.6	22.0	23.2	23.6	23.9	24.5	24.5
4	11.5	12.1	14.1	15.3	16.6	18.1	20.0	20.7	22.5	23.5	24.3	25.1	25.4	26.7	27.4	27.0	27.4	27.2
5	11.9	12.6	13.9	15.7	16.9	17.9	19.0	19.7	21.2	22.1	22.6	23.0	23.0	23.6	24.8	25.3	25.2	25.0
Kontr 1																		
1	10.11	14.3	14.5	14.9	13.6	14.5	16.2	14.9	16.5	18.4	21.3	23.2	22.4	25.3	26.5	26.6	26.4	26.2
2	9.16	12.0	13.0	14.0	12.5	12.4	14.4	14.0	15.7	16.9	20.1	21.7	20.1	23.5	24.6	26.4	27.1	27.4
3	10.30	13.9	14.0	14.2	12.6	12.1	14.2	13.1	14.0	15.7	17.8	18.6	23.1	20.0	21.0	20.8	22.1	22.4
4	10.25	12.5	13.9	14.9	13.8	14.7	16.6	15.1	16.5	17.7	20.3	21.4	24.3	23.7	24.0	23.8	25.3	25.6
5	10.46	13.6	14.1	14.8	13.1	13.9	16.3	14.8	16.6	17.8	20.2	21.2	21.5	22.5	23.2	23.5	24.9	24.6
Toets 2																		
1	11.9	13.4	14.3	16.1	17.7	18.7	20.5	21.5	22.7	23.5	22.2	23.8	23.7	24.4	24.7	24.6	25.6	25.9
2	12.2	14.0	15.2	17.8	15.9	20.0	21.5	22.4	23.6	24.3	25.2	25.7	26.6	27.4	28.0	28.2	28.3	29.0
3	13.3	15.5	16.1	18.3	14.9	19.7	21.6	21.5	22.4	23.7	23.5	24.5	24.7	25.4	25.8	25.6	26.1	26.7
4	11.8	13.8	14.2	16.0	17.8	17.9	19.5	20.0	20.7	21.5	22.0	23.4	22.5	24.2	24.5	23.9	24.5	24.9
5	10.8	12.7	13.3	15.5	17.7	16.8	18.5	19.2	19.9	20.3	20.2	21.2	20.4	21.9	21.9	22.0	22.4	23.3
Kontr. 2																		
1	12.11	14.7	16.1	17.3	17.2	19.8	20.2	21.2	22.0	23.0	23.5	24.4	25.2	25.9	26.1	26.8	26.6	27.5
2	11.82	13.0	14.2	15.0	18.8	16.5	17.7	17.8	19.3	18.6	19.7	20.6	21.3	21.6	22.2	22.6	22.4	22.6
3	10.6	11.0	13.8	18.8	19.0	16.3	18.3	18.7	19.7	19.4	20.1	21.9	22.2	23.6	23.7	24.2	24.8	25.5
4	12.3	14.2	14.9	16.5	17.0	18.5	20.0	20.5	21.8	22.5	23.3	24.9	24.2	25.8	26.7	27.4	27.9	27.9
5	11.0	12.6	14.3	15.7	16.2	18.7	21.5	21.6	23.2	23.4	24.0	24.9	24.9	25.8	26.2	27.0	24.4	24.3

AANHANGSEL 2

MUIS TESTES- EN SEMEN EVALUASIES

GROEP 1: KONTROLE 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3009	0.2692	0.3302	0.2787	0.3114
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	50.0	20.0	30.0	50.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2+ - 3	3	2 - 2+	3	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	214.0	90.0	156.0	227.0	185.0

GROEP 1: TOETS 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3892	0.5135	0.4692	0.3182	0.3408
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	90.0	70.0	50.0	20.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	3	3	2+ - 3	2	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	107	158	135	121	118

GROEP 1: KONTROLE 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3417	0.3418	0.2638	0.7452	0.3312
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	40.0	40.0	70.0	50.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2 - 2+	2 - 2+	3	2+ - 3	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	123	193	176	143	197

GROEP 1: TOETS 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3108	0.3295	0.5353	0.4059	0.2985
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	70.0	50.0	70.0	50.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	3	3	3	2 - 2+	2
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	166	140	118	133	82

Aanhangsel 2: Muis testes- en semen evaluasies

GROEP 2: KONTROLE 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2888	0.2488	0.3124	0.2903	0.2581
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	35.0	40.0	40.0	30.0	40.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2	2+ - 3	2+	2+ - 3	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	110	76	98	50	56

GROEP 2: TOETS 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3168	0.2760	0.2848	0.2561	0.3036
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	40.0	45.0	40.0	45.0	40.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	3	2+ - 3	2	3	2+ - 3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	125	80	78	106	125

GROEP 2: KONTROLE 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2597	0.3312	0.2466	0.2246	0.2147
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	38.0	25.0	50.0	20.0	20.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2+ - 3	2	3	2	2+
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	50	31	84	28	43

GROEP 2: TOETS 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2941	0.3030	0.3220	0.2986	0.2563
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	0.0	33.0	25.0	25.0	28.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	0	2	2 - 2+	2	2+
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	33	50	106	50	63

Aanhangsel 2: Muis testes- en semen evaluasies

GROEP 3: KONTROLE 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2843	0.2522	0.2654	0.2762	0.3360
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	30.0	40.0	50.0	50.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2+ - 3	2 - 2+	3	2+ - 3	2+ - 3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	93	89	206	103	111

GROEP 3: TOETS 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2372	0.2335	0.1870	0.2387	0.2244
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	10.0	20.0	60.0	30.0	20.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	1	2+	3	2 - 2+	2
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	66	114	121	85	295

GROEP 3: KONTROLE 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.1414	0.1587	0.2305	0.1354	0.1612
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	60.0	80.0	60.0	50.0	60.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2+ - 3	3	2+ - 3	2+ - 3	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	104	82	32	260	190

GROEP 3: TOETS 2

NS: Muis 5 is dood, daarom geen evaluasie.

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.2130	0.1745	0.1475	0.1842	Geen
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	30.0	50.0	10.0	60.0	Geen
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2	3	1	2+	Geen
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	104	88	6	163	Geen

Aanhangsel 2: Muis testes- en semen evaluasies

GROEP 4: KONTROLE 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3445	0.3432	0.3648	0.2960	0.3050
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	40.	40.0	40.0	30.0	40.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2	2 - 2+	2 - 2+	2	2+
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	120	229	61	108	54

GROEP 4: TOETS 1

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3450	0.3496	0.3853	0.3693	0.2887
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	70.0	60.0	30.0	30.0	40.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	3	3	2	2	2
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	117	72	70	94	25

GROEP 4: KONTROLE 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3136	0.2879	0.2014	0.2683	0.3346
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	10.0	50.0	50.0	60.0	50.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2+	2+ - 3	3	3	3
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	45	240	46	198	219

GROEP 4: TOETS 2

	MUIS 1	MUIS 2	MUIS 3	MUIS 4	MUIS 5
TESTIS MASSA (g)	0.3657	0.3331	0.2989	0.3557	0.2864
SPERM EVALUASIE:					
Kwantitatiewe motiliteit %	40.0	0.0	40.0	40.0	0.0
Kwalitatiewe motiliteit (0 - 3)	2 - 2+	0	2+	2+	0
Spermkonsentrasie ($\times 10^6/\text{ml}$)	90	93	67	156	35

AANHANGSEL 3

LABORATORIUM NOMMERS SOOS AAN ELKE MONSTER GEGEE VIR PATOLOGIESE EVALUASIE (slegs ter inligting)

Muis groep 1

T1.1	Toets 1	Muis 1
K1.2	Kontrole 1	Muis 1
T2.3	Toets 2	Muis 1
K2.4	Kontrole 2	Muis 1
T1.5	Toets 1	Muis 2
K1.6	Kontrole 1	Muis 2
T2.7	Toets 2	Muis 2
K2.8	Kontrole 2	Muis 2
T1.9	Toets 1	Muis 3
K1.10	Kontrole 1	Muis 3
T2.11	Toets 2	Muis 3
K2.12	Kontrole 2	Muis 3
T1.13	Toets 1	Muis 4
K1.14	Kontrole 1	Muis 4
T2.15	Toets 2	Muis 4
K2.16	Kontrole 2	Muis 4
T1.17	Toets 1	Muis 5
K1.18	Kontrole 1	Muis 5
T2.19	Toets 2	Muis 5
K2.20	Kontrole 2	Muis 5

Muis groep 2

T1.21	Toets 1	Muis 1
K1.22	Kontrole 1	Muis 1
T2.23	Toets 2	Muis 1
K2.24	Kontrole 2	Muis 1
T1.25	Toets 1	Muis 2
K1.26	Kontrole 1	Muis 2
T1.27	Toets 2	Muis 2
K2.28	Kontrole 2	Muis 2
T1.29	Toets 1	Muis 3

Muis groep 2 vervolg:

K1.30	Kontrole 1	Muis 3
T2.31	Toets 2	Muis 3
K2.32	Kontrole 2	Muis 3
T1.33	Toets 1	Muis 4
K1.34	Kontrole 1	Muis 4
T2.35	Toets 2	Muis 4
K2.36	Kontrole 2	Muis 4
T1.37	Toets 1	Muis 5
K1.38	Kontrole 1	Muis 5
T2.39	Toets 2	Muis 5
K2.40	Kontrole 2	Muis 5

Muis groep 3

T1.41	Toets 1	Muis 1
K1.42	Kontrole 1	Muis 1
T2.43	Toets 2	Muis 1
K2.44	Kontrole 2	Muis 1
T1.45	Toets 1	Muis 2
K1.46	Kontrole 1	Muis 2
T2.47	Toets 2	Muis 2
K2.48	Kontrole 2	Muis 2
T1.49	Toets 1	Muis 3
K1.50	Kontrole 1	Muis 3
T2.51	Toets 2	Muis 3
K2.51	Kontrole 2	Muis 3
T1.53	Toets 1	Muis 4
K1.54	Kontrole 1	Muis 4
T2.55	Toets 2	Muis 4
K2.56	Kontrole 2	Muis 4
T1.57	Toets 1	Muis 5
K1.58	Kontrole 1	Muis 5
T2.59	Toets 2	Muis 5
K2.60	Kontrole 2	Muis 5 (Dood)

Muis groep 4

T1.61	Toets 1	Muis 1
K1.62	Kontrole 1	Muis 1
T2.63	Toets 2	Muis 1
K2.64	Kontrole 2	Muis 1
T1.65	Toets 1	Muis 2
K1.66	Kontrole 1	Muis 2
T2.67	Toets 2	Muis 2
K2.68	Kontrole 2	Muis 2
T1.69	Toets 1	Muis 3
K1.70	Kontrole 1	Muis 3
T2.71	Toets 2	Muis 3
K2.72	Kontrole 2	Muis 3
T1.73	Toets 1	Muis 4
K1.74	Kontrole 1	Muis 4
T2.75	Toets 2	Muis 4
K2.76	Kontrole 2	Muis 4
T1.77	Toets 1	Muis 5
K1.78	Kontrole 1	Muis 5
T2.79	Toets 2	Muis 5
K2.80	Kontrole 2	Muis 5

PATOLOGIESE EVALUASIE VAN TESTESSNITTE: MUIS GROEP 1

Nommer	BUISE		INTERSTISIUM		SPERMATOGENESE	
	Basaal Membrane	Vorms	Fibroze	Leydig-selle	Kiemselle	Sertoli-selle
T1.1	N	N	-	N	N	N
K1.2	N	N	-	N	N	N
T2.3	N	N	-	N	N	N
K2.4	N	N	-	N	N	N
T1.5	N	N	-	N	N	N
K1.6	N	N	-	N	N	N
T2.7	N	N	-	N	N	N
K2.8	N	N	-	N	N	N
T1.9	N	N	-	N	N	N
K1.10	N	N	-	N	N	N
T2.11	N	N	-	N	N	N
K2.12	N	N	-	N	N	N
T1.13	N	N	-	N	N	N
K1.14	N	N	-	N	N	N
T2.15	N	N	-	N	N	N
K2.16	N	N	-	N	N	N
T1.17	N	N	-	N	N	N
K1.18	N	N	-	N	N	N
T2.19	N	N	-	N	N	N
K2.20	N	N	-	N	N	N
	N=Normaal +=Gering verdik ++=Erg verdik	N=Normaal Abn=Ab-Normale Vorms en Klein Deursnit	.=Afwesig +=Gering ++=Erg	N=Normaal Abn=Klein Fibroblasto- agtig, Donker Granules	N=Normale Spermato- Genese +↓=Gering onder druk ++↓=Erg onder druk	N=Normale Verhouding =1:13 Sertoli: Kiemselle Abn=Ab- Normale Verhouding

PATOLOGIESE EVALUASIE VAN MUIS TESTESSNITTE: MUIS GROEP 2

Nommer	BUISE		INTERSTISIUM		SPERMATOGENESE	
	Basaal Membrane	Vorms	Fibrose	Leydig-selle	Kiemselle	Sertoli-selle
T1.21	N	N	-	N	N	N
K1.22	N	N	-	N	N	N
T2.23	N	N	-	N	N	N
K2.24	N	N	-	N	N	N
T1.25	N	N	-	N	N	N
K1.26	N	N	-	N	N	N
T2.27	N	N	-	N	N	N
K2.28	N	N	-	N	N	N
T1.29	N	N	-	N	N	N
K1.30	N	N	-	N	N	N
T2.31	N	N	-	N	N	N
K2.32	N	N	-	N	N	N
T1.33	N	N	-	N	N	N
K1.34	N	N	-	N	N	N
T2.35	N	N	-	N	N	N
K2.36	N	N	-	N	N	N
T1.37	N	N	-	N	N	N
K1.38	N	N	-	N	N	N
T2.39	N	N	-	N	N	N
K2.40	N	N	-	N	N	N
	N=Normaal +=Gering verdik ++=Erg verdik	N=Normaal Abn=Ab-Normale Vorms en Klein Deursnit	=Afwesig +=Gering ++=Erg	N=Normaal Abn=Klein Fibroblasto- agtig, Donker Granules	N=Normale Spermato- Genese +↓=Gering onder druk ++↓=Erg onder druk	N=Normale Verhouding =1:13 Sertoli: Kiemselle Abn=Ab- Normale Verhouding

PATOLOGIESE EVALUASIE VAN MUIS TESTESSNITTE: MUIS GROEP 3

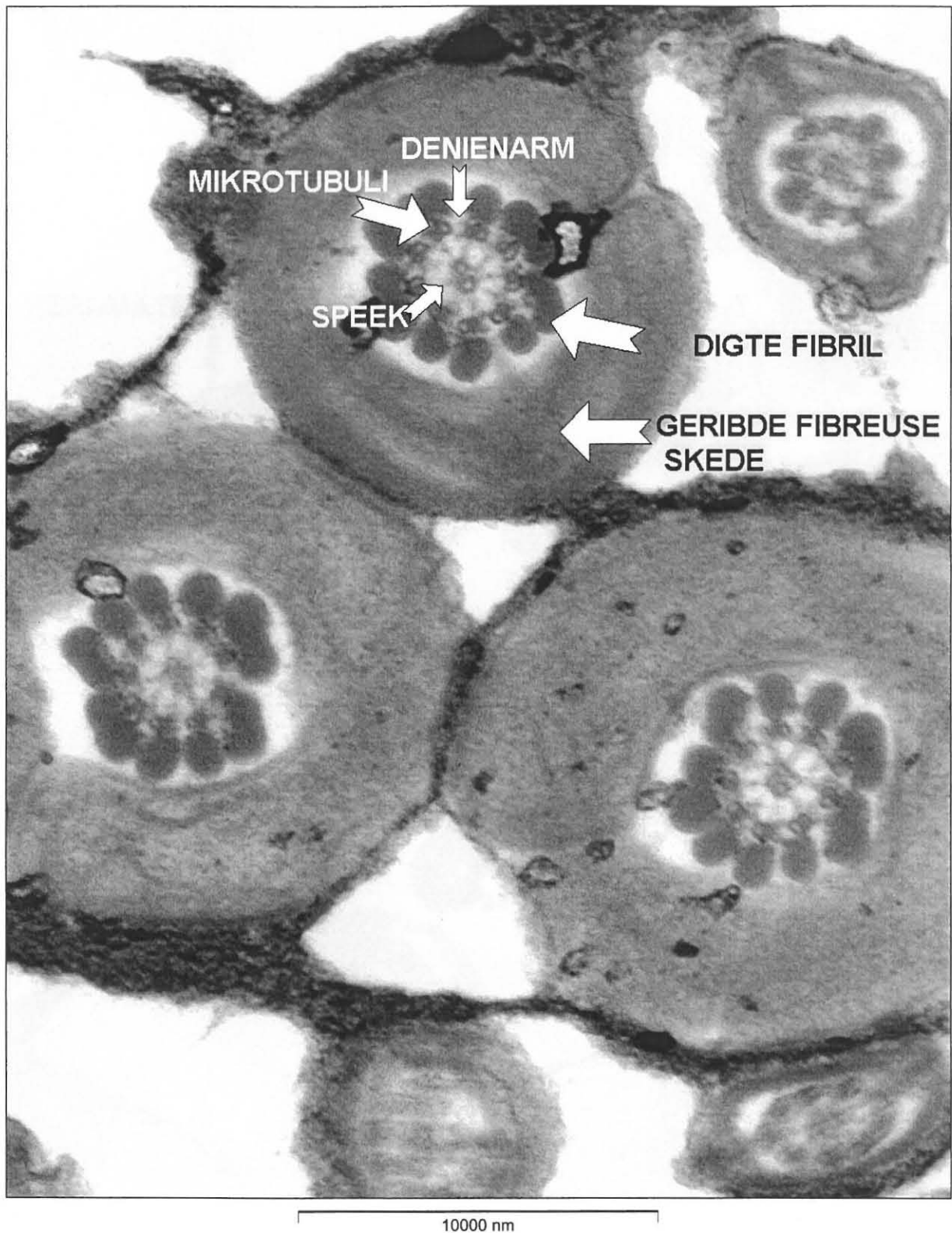
Nommer	BUISE		INTERSTISIUM		SPERMATOGENESE	
	Basaal Membrane	Vorms	Fibrose	Leydig-selle	Kiemselle	Sertoli-selle
T1.41	N	N	-	N	N	N
K1.42	N	N	-	N	N	N
T2.43	N	N	-	N	N	N
K2.44	N	N	-	N	N	N
T1.45	N	N	-	N	N	N
K1.46	N	N	-	N	N	N
T2.47	N	N	-	N	N	N
K2.48	N	N	-	N	N	N
T1.49	N	N	-	N	+↓ (slegs in 1 testis)	N
K1.50	N	N	-	N	N	N
T2.51	N	N	-	N	N	N
K2.52	N	N	-	N	N	N
T1.53	N	N	-	N	N	N
K1.54	N	N	-	N	N	N
T2.55	N	N	-	N	N	N
K2.56	N	N	-	N	N	N
T1.57	N	N	-	N	N	N
K1.58	-	-	-	-	-	-
T2.59	N	N	-	N	N	N
K2.60	N	N	-	N	N	N
	N=Normaal +=Gering verdik ++=Erg verdik	N=Normaal Abn=Ab-Normale Vorms en Klein Deursnit	=Afwesig +=Gering ++=Erg	N=Normaal Abn=Klein Fibroblasto-agtig, Donker Granules	N=Normale Spermato-Genese +↓=Gering onder druk ++↓=Erg onder druk	N=Normale Verhouding= 1:13 Sertoli: Kiemselle Abn=Ab-Normale Verhouding

PATOLOGIESE EVALUASIE VAN MUIS TESTESSNITTE: MUIS GROEP 4

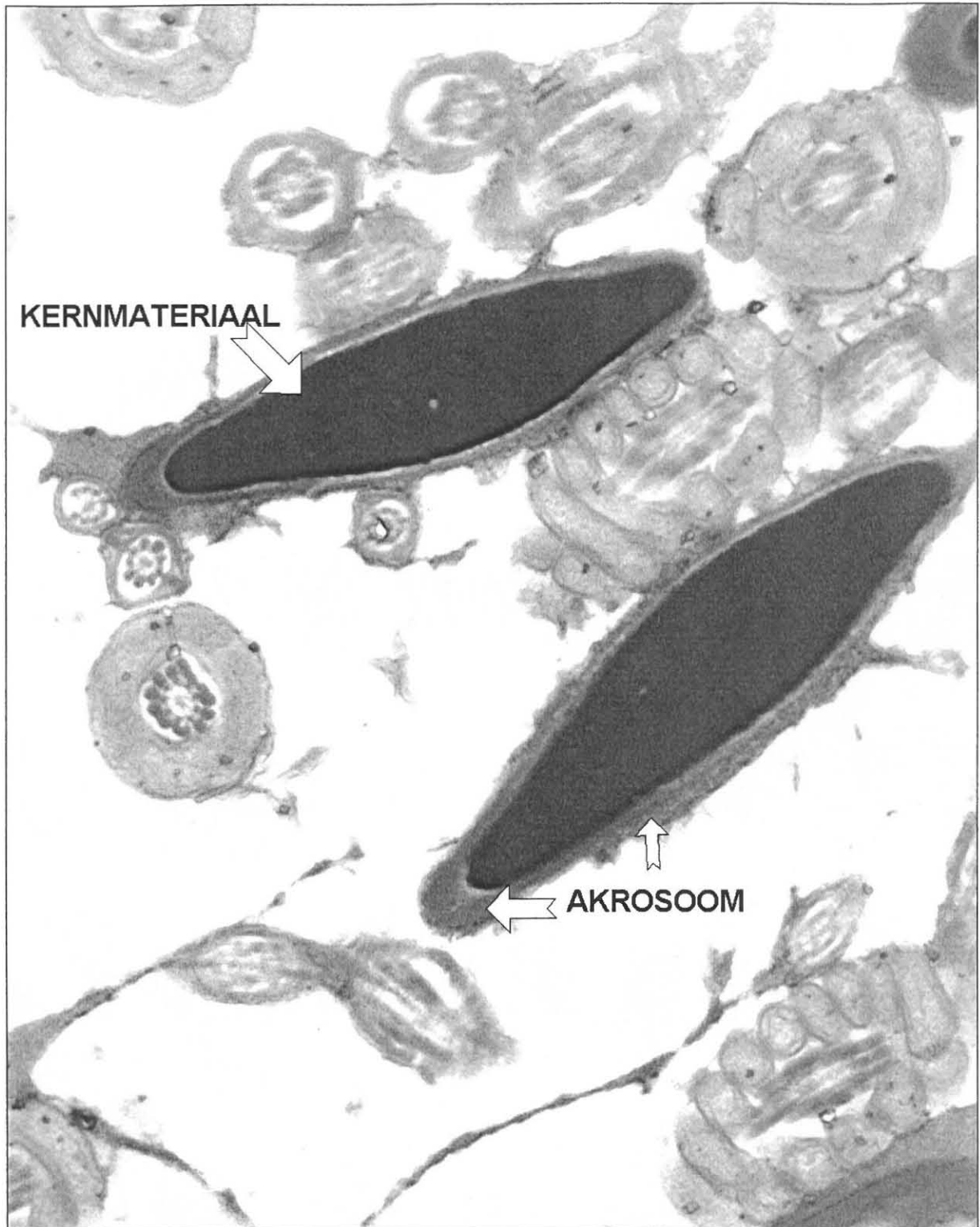
Nommer	BUISE		INTERSTISIUM		SPERMATOGENESE	
	Basaal Membrane	Vorms	Fibrose	Leydig-selle	Kiemselle	Sertoli-selle
T1.61	N	N	-	N	N	N
K1.62	N	N	-	N	N	N
T2.63	N	N	-	N	N	N
K2.64	N	N	-	N	N	N
T1.65	N	N	-	N	N	N
K1.66	N	N	-	N	N	N
T2.67	N	N	-	N	N	N
K2.68	N	N	-	N	N	N
T1.69	N	N	-	N	N	N
K1.70	N	N	-	N	N	N
T2.71	N	N	-	N	N	N
K2.72	N	N	-	N	N	N
T1.73	N	N	-	N	N	N
K1.74	N	N	-	N	N	N
T2.75	N	N	-	N	N	N
K2.76	N	N	-	N	N	N
T1.77	N	N	-	N	N	N
K1.78	N	N	+ (slegs 1 testis)	N	+↓ (slegs 1 testis)	N
T2.79	N	N	-	N	N	N
K2.80	N	N	-	N	N	N
	N=Normaal +=Gering verdik ++=Erg verdik	N=Normaal Abn=Ab-Normale Vorms en Klein Deursnit	=Afwesig +=Gering ++=Erg	N=Normaal Abn=Klein Fibroblasto-agtig, Donker Granules	N=Normale Spermato-Genese +↓=Gering onder druk ++↓=Erg onder druk	N=Normale Verhouding= 1:13 Sertoli: Kiemselle Abn=Ab-Normale Verhouding

AANHANGSEL 4

Elektronmikroskopiese afdrucke van spermatozoa wat normale morfologiese kenmerke van spermkoppe en aksoneem 9+9+2 patroon aandui.



AKSONEEM 9+9+2 PATROON



Spermkop